



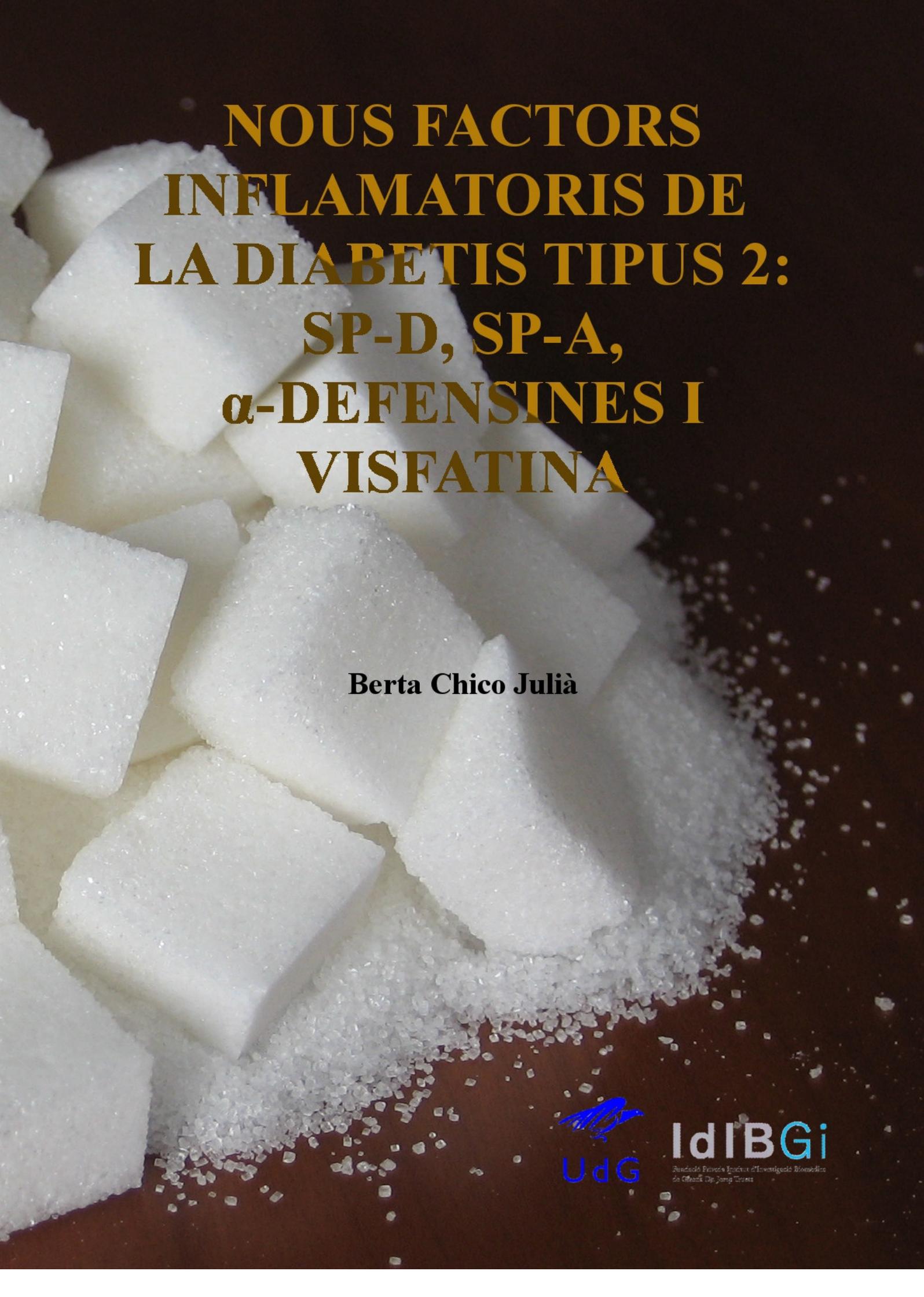
Universitat de Girona

**NOUS FACTORS INFLAMATORIS DE LA DIABETIS  
TIPUS 2: SP-D, SP-A, A-DEFENSINES I VISFATINA**

**Berta CHICO JULIÀ**

**ISBN: 978-84-692-2298-0**

**Dipòsit legal: GI-398-2009**



**NOUS FACTORS  
INFLAMMATORIS DE  
LA DIABETIS TIPUS 2:  
SP-D, SP-A,  
 $\alpha$ -DEFENSINES I  
VISFATINA**

**Berta Chico Julià**



**IdIBGi**  
Fundació Privada Espanyola d'Investigació Biomèdica  
de l'Àrea de la Salut i el Treball











UNIVERSITAT DE GIRONA



IdIBGi: Fundació Privada Institut d'Investigació  
Biomèdica de Girona Dr. Josep Trueta  
Departament d'Endocrinologia. UDEN  
Laboratori de Recerca



# **NOUS FACTORS INFLAMATORIS DE LA DIABETIS TIPUS 2: SP-D, SP-A, $\alpha$ -DEFENSINES I VISFATINA**

**Berta Chico Julià**  
**Girona, Desembre 2008**

Director de la tesi: Dr. José Manuel Fernández-Real Lemos



**NOUS FACTORS INFLAMATORIS DE LA DIABETIS TIPUS 2:  
SP-D, SP-A,  $\alpha$ -DEFENSINES I VISFATINA**

Tesi doctoral del programa de doctorat  
“**Ciències: Química i física de les molècules i els materials, ciències de la salut i biotecnologia**” Itinerari de Biotecnologia de la Universitat de Girona presentada per **Berta Chico Julià**.



**U d G**

Tesi realitzada al Laboratori de Recerca del Departament d'Endocrinologia de **IdIBGi: Fundació Privada Institut d'Investigació Biomèdica de Girona Dr. Josep Trueta** sota la direcció del Dr. José Manuel Fernández-Real.

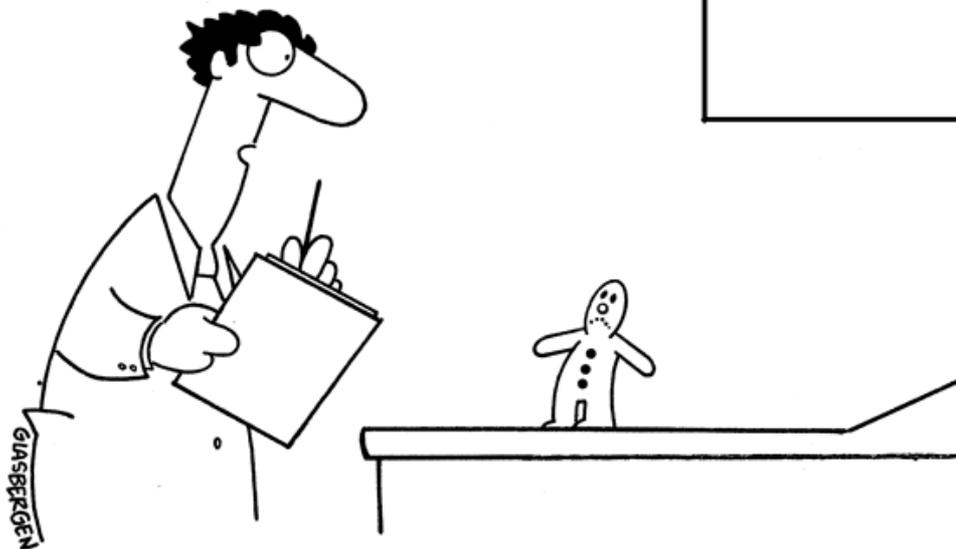
**IdIBGi**

Fundació Privada Institut d'Investigació Biomèdica  
de Girona Dr. Josep Trueta

Girona, Desembre 2008.



Copyright 2005 by Randy Glasbergen.  
www.glasbergen.com



**"Your blood sugar is too high."**

Copyright 2005 by Randy Glasbergen.  
www.glasbergen.com



**"You went camping and a bear mistook your blood for honey.  
Would you mind if I ordered a diabetes test for you?"**



**Aquest esforç va dedicat als que m'han fet viure moments divertits en la vida, als que m'han fet riure. Gràcies! Són els que incondicionalment sempre em recolzen, aproven el que faig i m'aconsellen amb tot el cor. Aquells que veuen i coneixen el millor i també el pitjor de mi i ho accepten: en David (sense tu no hagués pogut escriure la tesi, quina paciència has tingut noi), els meus Pares, l'Eulàlia (la meva germana), en Carles (el meu cunyat) i l'Ernest (el meu nebot de tres anys). No puc dir res, ja sabeu que sóc una mica bleda i m'emociono per qualsevol cosa i tot el que escrigui quedaria petit. Agrair-vos haver-me donat l'empenta que em falta a vegades i dir-vos que us estimo molt. Gràcies, gràcies, gràcies!**



## AGRAÏMENTS

Vull agrair al Dr. José Manuel Fernández-Real Lemos, director d'aquesta tesi, que hagi confiat en mi. A l'Abel López per haver-me facilitat les coses i per explicar-me conceptes mèdics i estadístics. A l'Eduardo Esteve agrair-li el seu bon humor i la col·laboració en la tesina, sobretot. Gràcies, també, a en Wifredo Ricart i al departament d'endocrinologia pel seu suport. I vull fer un agraïment especial a l'Anna Pibernat per posar-me en contacte amb el departament de cardiologia. A l'equip del Dr. Masanori Shiratori per la seva formalitat i per l'anàlisi de la concentració de SP-A.

Vull fer un especial agraïment als *boys* del departament: Gerard, Jose, Paco, i a l'Òscar pel seu bon rotllo. Vull donar les gràcies sobretot, sobretot, sobretot a la Judit Bassols per haver arribat a temps i ajudar-me tant i tant en les tècniques de laboratori, en el redactat i en l'anàlisi de resultats, i per l'amistat i consells més enllà de la ciència. Gràcies a totes les nenes del laboratori: a la Carme Gubern per haver-me ensenyat tantes coses, a la Cristina Oliveres, a la Rocío (amb qui he pogut compartir moments musicals), a la Judit Malloles i a la Jess. Gràcies a les nenes de l'hora de dinar (de l'IdIBGi i de l'ICO): la Glòria Oliveras, la Gemma Casals, la Teresa Puig (moltes gràcies per "salvar-me la vida" més d'una vegada), la Marta Riera, la Laia Merchán (per haver-nos fet riure tant), la Rut Porta (per tants consells ben donats i escoltar-me tantes i tantes vegades), l'Anna, la Rut Martí, la Cristina, la Montse, la Paula, la Maria del Mar i l'Anna. Gràcies a elles m'he sentit com a casa, han aguantat les meves neures i m'han fet riure molt i molt. A l'Ester de la biblioteca per tots els articles. A en Narcís Torrent per fer-me veure que mai és tard i donar alegria a estones avorrides de la vida, i per fer d'espectador en la meva gran passió: la música. A en Jordi Rubió per compartir amb mi xerrades i concerts sobre un ídol: en Bruce Springsteen. Posats a agrair: gràcies a en

Bruce Springsteen, als Fleetwood Mac i a la Cyndi Lauper per acompanyar-me en hores tant carregoses.

A la Marta Toledo a qui desitjo el millor a Miami i que sàpiga que tot això ho he escrit amb el seu ordinador. A l'Antonio de registres per imprimir-me la tesina i per ser tan servicial i bonifici. Als informàtics del Trueta per arreglar-me tantes vegades l'ordinador del despatx. A en Lluís Pagès i a en Vicenç Oliveres per ensenyar-me tècniques de laboratori.

A Gramola Orquestra (Xevi, Darío, David F, David M, David S, David V, Eduard, Helena, Joaquín, Jordi F, Jordi Q, Lluís, Núria...) per haver-me donat l'oportunitat de desfogar-me amb el cant i conèixer poblets de Catalunya que ni sabia que existien. I a la Mariona per les lliçons de cant i de posada en escena.

Als amics de la colla d'Arbúcies i a la Susanna, a les nenes d'Arbúcies, als de Reference, als del General Lab, als de la Clínica Girona i als del St. Joan de Déu.

Als que ja no hi són i recordo tot sovint: els meus avis i abuelos, i l'Eduard Vallès.

A la família Vallès: Dolors; Eduard (gràcies per les lliçons d'estadística) i Assumpció; Dolors, Xavier, Oriol, Xavier i Irene; Montse, Ireneu i Nicolau; Neus, Artur (gràcies per motivar-me cap a noves etapes professionals), Bernat, Pau i Enric; Jordi; Antònia i Paula; gràcies per tot.

Berta





---

ÍNDIX GENERAL

---

<b>ÍNDIX GENERAL</b>	<b>i</b>
<b>ÍNDIX DE FIGURES</b>	<b>v</b>
<b>ÍNDIX DE TAULES</b>	<b>ix</b>
<b>LLISTAT D'ABREVIACIONS</b>	<b>xi</b>
<b>DEFINICIONS I CONCEPTES MÈDICS I GENÈTICS</b>	<b>xvii</b>
<b>1. INTRODUCCIÓ</b>	<b>1</b>
1.1.LA DIABETIS	3
1.1.1.CRITERIS PER DIAGNOSTICAR LA DIABETIS MELLITUS	5
1.1.2.SIMPTOMATOLOGIA DE LA HIPERGLUCÈMIA	6
1.2.LA SÍNDROME DE LA RESISTÈNCIA A LA INSULINA (SRI) O LA SÍNDROME METABÒLICA	7
1.2.1.FACTORS ASSOCIATS A LA SRI	8
1.2.1.1.Obesitat i distribució central (abdominal) del greix corporal	9
1.2.1.2.Hipertensió	11
1.2.1.3.Dislipidèmia: hipertrigliceridèmia, altes concentracions de colesterol LDL i baixes concentracions de colesterol HDL	12
1.2.1.4.El ferro	13
1.2.1.5.Hiperuricèmia	15
1.2.1.6.Acumulació de greix al fetge	15
1.2.2.INFLAMACIÓ, SRI I DIABETIS	15
1.2.2.1.Inflamació i Obesitat	19
1.3.MECANISMES MOLECULARS	23
1.3.1.LA INSULINA	23
1.3.2.EL RECEPTOR DE LA INSULINA	28
1.3.3.LES CITOQUINES I ALTRES MOLÈCULES IMPLICADES	32
1.3.4.ALGUNS MARCADORS INFLAMATORIS	39
1.4.GENÈTICA I DM 2	43
1.4.1.ELS POLIMORFISMES D'UN SOL NUCLEÒTID (SNPs)	49
<b>INTRODUCCIÓ A LES PROTEÏNES OBJECTE D'ESTUDI EN AQUESTA TESI</b>	<b>53</b>
<b>1.5.SP-D: PROTEÏNA SURFACTANT D</b>	<b>55</b>
1.5.1.ESTRUCTURA DE LA PROTEÏNA	55
1.5.2.LOCALITZACIÓ DE L' SP-D	58
1.5.3.FUNCIONS DE L' SP-D	59
1.5.3.1.Funcions respiratòries	60
1.5.3.2.Funcions immunitàries	60
<i>I.Reconeixement de patògens mitjançant SP-D</i>	62
<i>Ia.Interacció de l' SP-D amb virus</i>	62
<i>Ib.Interacció de l' SP-D amb bacteris</i>	63
<i>Ic.Interacció de l' SP-D amb llevats i fongs</i>	63
<i>II.Paper de l' SP-D en la resistència a la inflamació al·lèrgica i la hipersensibilitat</i>	64
<i>III.Funcions extrapulmonars de l' SP-D</i>	65
<i>IIIa.Funció de l' SP-D a l'epiteli gàstric</i>	66

<i>IIIb.Funció de l' SP-D a nivell d'aparell genital</i>	66
<i>IIIc.Funció de l' SP-D a les secrecions i líquids biològics</i>	67
1.5.4.MOLÈCULES DE SUPERFÍCIE CEL·LULAR QUE INTERACCIONEN AMB L' SP-D	68
1.5.4.1.La Glicoproteïna 340 (gp-340)	68
1.5.4.2.CD14	68
1.5.4.3.Complexe <i>Calreticulin-CD91</i>	68
1.5.4.4.SIRP $\alpha$ (Proteïna $\alpha$ reguladora de senyal) (CD172)	69
1.5.4.5.TLR2 i TLR4	69
1.5.5.SP-D i DIABETIS	70
1.5.6.EL GEN DE L' SP-D ( <i>SFTPD</i> )	73
1.5.6.1.Regulació de l'expressió del gen de l' SP-D	74
1.5.6.2.Els polimorfismes del gen <i>SFTPD</i> i la seva relació amb la concentració de SP-D	76
<b>1.6.SP-A: PROTEÏNA SURFACTANT A</b>	<b>79</b>
1.6.1.ESTRUCTURA DE L' SP-A	79
1.6.2.LOCALITZACIÓ DE L' SP-A	82
1.6.3.FUNCIONS DE L' SP-A	83
1.6.3.1.Funcions respiratòries	84
1.6.3.2.Funcions immunitàries	84
<i>I.Reconeixement de patògens mitjançant SP-A</i>	86
<i>Ia.Interacció de l' SP-A amb virus</i>	86
<i>Ib.Interacció de l' SP-A amb bacteris</i>	87
<i>Ic.Interacció de l' SP-A amb llevats i fongs</i>	88
<i>II.Paper de l' SP-A en la resistència a la inflamació al·lèrgica i en la hipersensibilitat</i>	89
<i>III.Funcions extrapulmonars de l' SP-A</i>	90
<i>IIIa.Funció de l' SP-A a nivell d'aparell genital</i>	90
<i>IIIb.Funció de l' SP-A a les secrecions i líquids biològics</i>	91
1.6.4.MOLÈCULES DE SUPERFÍCIE CEL·LULAR QUE INTERACCIONEN AMB L' SP-A	92
1.6.4.1.El receptor C1q per fagocitosi (C1qRp) o CD93	92
1.6.4.2.La glicoproteïna 340 (gp-340)	92
1.6.4.3.CD14	93
1.6.4.4.Complex <i>Calreticulin-CD91</i>	93
1.6.4.5.SIRP $\alpha$	93
1.6.4.6.TLR2	94
1.6.4.7.SP-R210	95
1.6.5.SP-A i DIABETIS	96
1.6.6.EL GEN DE L' SP-A	98
1.6.6.1.Regulació de l'expressió del gen de l' SP-A	99
<b>1.7. LES DEFENSINES</b>	<b>103</b>
1.7.1.LES $\alpha$ -DEFENSINES (HNP: pèptid de neutròfils humans o DEFA: alfadefensines)	104
1.7.2.FUNCIONS DE LES DEFENSINES	107
1.7.2.1.Funció antibacteriana o antifúngica	107
1.7.2.2.Funció antivírica	110
1.7.2.3.Funció immunoreguladora	114
1.7.2.4.Altres funcions	116
1.7.3.DEFENSINES, INFLAMACIÓ I DIABETIS	116
1.7.4.EL GEN DE LES DEFENSINES	117
1.7.4.1.Regulació de l'expressió genètica de les defensines	117
<b>1.8. LA VISFATINA</b>	<b>119</b>
1.8.1.CLASSIFICACIÓ, ESTRUCTURA I LOCALITZACIÓ DE LA	

VISFATINA	119
1.8.2.FUNCIONS DE LA VISFATINA	121
1.8.2.1.Funcions metabòliques de la visfatina: acció sobre la glucosa i funció a nivell adipocitari	121
1.8.2.2.Funcions de la visfatina a nivell immunològic	124
1.8.2.3.Altres funcions de la visfatina	126
1.8.3.VISFATINA, OBESITAT, SÍNDROME METABÒLICA I DIABETIS	126
1.8.4.EL GEN DE LA VISFATINA: <i>PBEF1</i>	129
<b>2.HIPÒTESIS I OBJECTIUS</b>	<b>135</b>
<b>3.MATERIALS I MÈTODES</b>	<b>141</b>
3.1.SUBJECTES I PROTOCOLS PER L'SP-D	143
3.1.1.SUBJECTES ESTUDIATS	143
3.1.2.MESURES ANTROPOMÈTRIQUES	147
3.1.3.PROTOCOL DE L'ESTUDI	148
3.2.3.1.Tests	149
3.2.MÈTODES ANALÍTICS	151
3.2.1.RECOLLIDA DE MOSTRES	151
3.2.2.ALTRES ANÀLISIS	151
3.2.3.MESURA DE LA CONCENTRACIÓ DE SP-D	155
3.2.4.ANÀLISI DEL POLIMORFISME DE L'SP-D	156
3.2.4.1.Sistema d'extracció d'ADN	156
3.2.4.2.Amplificació de l'ADN i discriminació al·lèlica	157
3.2.5.MESURA DE LA CONCENTRACIÓ DE SP-A	162
3.2.6.MESURA DE LA CONCENTRACIÓ D'ALFA-DEFENSINES	162
3.2.7.MESURA DE LA CONCENTRACIÓ DE VISFATINA	163
3.3.ESTUDI <i>IN VITRO</i> : CULTIUS CEL·LULARS	165
3.3.1.EXTRACCIÓ D'ARN	167
3.3.2.RETROTRANSCRIPCIÓ DE L'ARN (síntesi d'ADN complementari)	169
3.3.3.PCR (REACCIÓ EN CADENA DE LA POLIMERASA) DEL GEN DE L'SP-D I DE LA BETA-ACTINA	170
3.3.4.PROTOCOLS D'ÚS PER CULTIUS CEL·LULARS	173
3.3.4.1.Protocol de tripsinització de cultius cel·lulars	173
3.3.4.2.Protocol de comptatge de cèl·lules viables	175
3.3.4.3.Protocol de congelació de cèl·lules	175
3.3.4.4.Protocol de descongelació de cèl·lules	176
3.3.4.5.Preparació del tampó de càrrega ( <i>loading buffer</i> 10x)	176
3.4.MÈTODES ESTADÍSTICS	177
3.5.EQUIPAMENT I MATERIAL QUÍMIC I BIOLÒGIC	179
<b>4.RESULTATS</b>	<b>181</b>
4.1.RESULTATS DE LA 1ª PART: L'SP-D	183
4.1.1.RELACIÓ DE L'SP-D CIRCULANT AMB LA TOLERÀNCIA A LA GLUCOSA I EL FET DE FUMAR	183
4.1.2.RELACIÓ DE L'SP-D AMB VARIABLES DEL METABOLISME DE	

LA GLUCOSA I INFLAMACIÓ	189
4.1.3.RELACIÓ ENTRE EL POLIMORFISME DEL GEN DE L'SP-D I LES VARIABLES METABÒLIQUES	192
4.1.4.REPLICACIÓ DE L'ESTUDI	196
4.1.5.EFECTES DEL SALICILAT EN L'SP-D CIRCULANT	199
4.1.6.ESTUDI <i>IN VITRO</i>	203
4.2.RESULTATS DE LA 2ª PART: L'SP-A	207
4.2.1.RELACIÓ DE L'SP-A CIRCULANT I EL FET DE FUMAR	207
4.2.2.RELACIÓ DE L'SP-A AMB VARIABLES DEL METABOLISME DE LA GLUCOSA I INFLAMACIÓ	209
4.3.RESULTATS DE LA 3ª PART: LES DEFENSINES	219
4.3.1.RELACIÓ DE LES DEFA 1-3 CIRCULANTS AMB ELS PARÀMETRES METABÒLICS D'HOMES APARENTMENT SANS	221
4.3.2.RELACIÓ DE LES DEFA 1-3 CIRCULANTS AMB LA FUNCIO VASCULAR EN HOMES APARENTMENT SANS	225
4.3.3.RELACIÓ DE LES DEFA 1-3 CIRCULANTS I ELS PARÀMETRES METABÒLICS EN HOMES APARENTMENT SANS PER ANÀLISI BIVARIANT I ANÀLISI DE REGRESSIÓ MÚLTIPLE	226
4.4.RESULTATS DE LA 4ª PART: LA VISFATINA	231
4.4.1.RELACIÓ DE LA VISFATINA CIRCULANT EN HOMES NO DIABÈTICS AMB LA SECRECIÓ D'INSULINA I AMB LA SENSIBILITAT A LA INSULINA	232
4.4.2.RELACIÓ DE LA VISFATINA CIRCULANT AMB LA DM 2	234
4.4.3.RELACIÓ DE LA CONCENTRACIÓ DE VISFATINA CIRCULANT I LA DM 1	238
<b>5.DISCUSSIÓ</b>	<b>239</b>
5.1.DISCUSSIÓ DELS RESULTATS DE LA 1ª PART	243
5.2.DISCUSSIÓ DELS RESULTATS DE LA 2ª PART	249
5.3.DISCUSSIÓ DELS RESULTATS DE LA 3ª PART	255
5.4.DISCUSSIÓ DELS RESULTATS DE LA 4ª PART	259
<b>6.CONCLUSIONS</b>	<b>265</b>
<b>7.BIBLIOGRAFIA</b>	<b>271</b>
<b>8.ANEX</b>	<b>321</b>

ÍNDIX DE FIGURES

<b>Figura 1.1.</b>	Pàncrees humà	<b>5</b>
<b>Figura 1.2.</b>	Esquema general de la síndrome metabòlica com a desencadenant de Diabetis Mellitus tipus 2	<b>8</b>
<b>Figura 1.3.</b>	La inflamació com a desencadenant de la síndrome metabòlica i consegüentment DM2	<b>17</b>
<b>Figura 1.4.</b>	Factors desencadenants de la SRI	<b>18</b>
<b>Figura 1.5.</b>	Possibles vies que determinen la inflamació crònica donant com a resultat aterosclerosi	<b>19</b>
<b>Figura 1.6.</b>	Òrgans insulinodependents i òrgans insulinoindependents	<b>24</b>
<b>Figura 1.7.</b>	Accions de la insulina	<b>25</b>
<b>Figura 1.8.</b>	Ruta de síntesi d'insulina	<b>26</b>
<b>Figura 1.9.</b>	Model simplificat de reaccions que desencadena la unió al RI	<b>31</b>
<b>Figura 1.10.</b>	Model de la via de senyalització metabòlica ( <i>signaling</i> ) i inflamatòria en adipòcits o macròfags	<b>38</b>
<b>Figura 1.11.</b>	Exemple de SNP	<b>49</b>
<b>Figura 1.12.</b>	Regions gèniques on es poden trobar els SNPs	<b>50</b>
<b>Figura 1.13.</b>	Exemple d'haplotip	<b>51</b>
<b>Figura 1.5.1.</b>	Seqüència d'aminoàcids de l' SP-D	<b>56</b>
<b>Figura 1.5.2.</b>	Estructura proteica i del gen de l' SP-D	<b>57</b>
<b>Figura 1.5.3.</b>	Estructura tridimensional d'un fragment de l' SP-D	<b>58</b>
<b>Figura 1.5.4.</b>	Localització del gen <i>SFTPD</i> al cromosoma 10	<b>73</b>
<b>Figura 1.5.5.</b>	Localització del gen <i>SFTPD</i> dins el cromosoma 10	<b>73</b>
<b>Figura 1.6.1.</b>	Estructura proteica i del gen de l' SP-A	<b>80</b>
<b>Figura 1.6.2.</b>	Seqüència d'aminoàcids de l' SP-A	<b>81</b>
<b>Figura 1.6.3.</b>	Receptors de col·lectines com SP-A (i SP-D)	<b>96</b>
<b>Figura 1.6.4.</b>	Locus dels gens del surfactant (SP-A i SP-D)	<b>99</b>
<b>Figura 1.7.1.</b>	Model de formació de porus mitjançant dímers de defensines	<b>107</b>
<b>Figura 1.7.2.</b>	Acció de les defensines sobre la membrana cel·lular bacteriana	<b>109</b>
<b>Figura 1.7.3.</b>	Mecanismes de l'activitat antivírica de les defensines	<b>112</b>

<b>Figura 1.7.4.</b> Paper de les defensines en la immunitat de les mucoses contra la infecció de l'HIV	<b>115</b>
<b>Figura 1.8.1.</b> Seqüència d'aminoàcids de la visfatina	<b>120</b>
<b>Figura 1.8.2.</b> Esquema de proteïnes sintetitzades pels adipòcits i cadena de reaccions	<b>122</b>
<b>Figura 1.8.3.</b> Receptor de la insulina	<b>123</b>
<b>Figura 1.8.4.</b> Acció de la visfatina	<b>127</b>
<b>Figura 1.8.5.</b> Localització del gen <i>PBEF1</i> al cromosoma 7	<b>129</b>
<b>Figura 1.8.6.</b> Estructura del gen de la visfatina	<b>130</b>
<b>Figura 3.1.</b> Unions ( <i>matches</i> ) i males unions ( <i>mismatches</i> ) entre la seqüència diana i la sonda en TaqMan SNP Genotyping Assays	<b>160</b>
<b>Figura 4.1.1.</b> Histograma mostrant una distribució normal de la transformació logarítmica de l'SP-D sèrica en la població estudiada (Resultats SP-D).	<b>183</b>
<b>Figura 4.1.2.</b> 95% d'interval de confiança per la mitjana del log-SP-D sèrica d'acord amb l'estat de tolerància a la glucosa i el fet de fumar (Resultats SP-D).	<b>186</b>
<b>Figura 4.1.3.</b> Log-SP-D sèrica en pacients DM 1 d'acord amb l'estat de fumar (Resultats SP-D).	<b>187</b>
<b>Figura 4.1.4.</b> Interval de confiança per la mitjana del log-SP-D sèrica d'acord amb l'ús d'aspirina i l'estat de fumar en pacients DM 2 (Resultats SP-D).	<b>188</b>
<b>Figura 4.1.5.</b> Associació lineal entre l'SP-D sèrica i la sensibilitat a la insulina en subjectes intolerants a la glucosa (Resultats SP-D).	<b>190</b>
<b>Figura 4.1.6.</b> 95% d'interval de confiança per la mitjana del log-SP-D i log LBP d'acord amb l'estat de tolerància a la glucosa i del fumar (Resultats SP-D).	<b>191</b>
<b>Figura 4.1.7.</b> Interval de confiança per la mitjana del log-SP-D sèrica d'acord amb el polimorfisme Met <sup>11</sup> Thr del gen de l'SP-D estudiat, l'estat de tolerància a la glucosa i l'estat de fumar (Resultats SP-D).	<b>193</b>
<b>Figura 4.1.8.</b> Interval de confiança per la mitjana de la glucosa sèrica 2 hores després del test oral de tolerància a la glucosa d'acord amb el polimorfisme Met <sup>11</sup> Thr del gen de l'SP-D (Resultats SP-D).	<b>194</b>
<b>Figura 4.1.9.</b> Interval de confiança per la mitjana de la sensibilitat a la insulina	

d'acord amb el polimorfisme Met <sup>11</sup> Thr del gen de l'SP-D en subjectes no-fumadors obesos i amb sobrepès (Resultats SP-D).	196
<b>Figura 4.1.10.</b> Interval de confiança per la mitjana de la concentració de SP-D i la mitjana de l'IMC d'acord amb el polimorfisme Met <sup>11</sup> Thr del gen de l'SP-D en la replicació de l'estudi (Resultats SP-D)	198
<b>Figura 4.1.11.</b> Estudi dels efectes del salicilat en un 95% d'interval de confiança de la mitjana de la glucosa sèrica en dejú d'acord amb el polimorfisme Met <sup>11</sup> Thr del gen de l'SP-D (Resultats SP-D).	201
<b>Figura 4.1.12.</b> Estudi dels efectes del salicilat sobre l'SP-D sèrica d'acord amb el polimorfisme Met <sup>11</sup> Thr de l'SP-D (Resultats SP-D).	202
<b>Figura 4.1.13.</b> Associació lineal entre l'SP-D sèrica i l'activitat insulínica en subjectes obesos (Resultats SP-D).	203
<b>Figura 4.1.14.</b> Efecte de la insulina i la combinació d'insulina + glucosa en la concentració d'ARNm de l'SP-D en cèl·lules A549 (Resultats SP-D)	204
<b>Figura 4.1.15.</b> Efectes de la insulina i la combinació d'insulina + glucosa en la secreció de SP-D en cèl·lules A549 (Resultats SP-D)	206
<b>Figura 4.2.1.</b> 95% d'interval de confiança per la mitjana de la concentració sèrica de SP-A d'acord amb el fet de fumar (Resultats SP-A)	207
<b>Figura 4.2.2.</b> 95% d'interval de confiança per la mitjana de la concentració sèrica de SP-A d'acord amb el número de cigarretes fumades al dia (Resultats SP-A)	208
<b>Figura 4.2.3.</b> Interval de confiança per la mitjana del log de l'SP-A sèrica d'acord amb l'estat de la tolerància a la glucosa (Resultats SP-A)	211
<b>Figura 4.2.4.</b> Els efectes de l'estat de tolerància a la glucosa sobre la concentració sèrica de SP-A són additius al fet de fumar (Resultats SP-A)	213
<b>Figura 4.2.5.</b> Associació lineal entre la concentració de SP-A sèrica i l'índex cintura-maluc (WHR) (A); i entre la concentració de SP-A sèrica i la sensibilitat a la insulina (B) (Resultats SP-A)	216
<b>Figura 4.3.1.</b> Gràfic de barres d'error de l'IMC i la S <sub>I</sub> d'acord amb les DEFA 1-3 circulants en homes aparentment sans (Resultats defensives)	223
<b>Figura 4.3.2.</b> Gràfica de barres d'error del colesterol total i el colesterol LDL d'acord amb les DEFA 1-3 circulants en homes aparentment sans	

(Resultats defensines)	224
<b>Figura 4.3.3.</b> Gràfica amb barres d'error de la vasodilatació endotelidependent i endoteliindependent (reactivitat de l'artèria braquial) d'acord amb les DEFA 1-3 circulants en homes aparentment sans amb sobrepès (Resultats defensines)	226
<b>Figura 4.4.1.</b> Gràfica amb la correlació del $\log_{10}$ d'AIRg amb el $\log_{10}$ de la concentració de visfatina en sèrum en homes tolerants a la Glucosa (Resultats visfatina).	233
<b>Figura 4.4.2.</b> Correlació de l'HbA1c amb $\log_{10}$ de la concentració de visfatina en sèrum en pacients DM 2 (Resultats visfatina).	235
<b>Figura 4.4.3.</b> Barres d'error de la concentració de visfatina en sèrum en els diferents grups d'individus estudiats (Resultats visfatina).	237

ÍNDIX DE TAULES

<b>Taula 1.7.1.</b>	Resum de l'origen, distribució i síntesi de les defensines	<b>106</b>
<b>Taula 3.1.</b>	Equipament de recerca utilitzat.	<b>179</b>
<b>Taula 4.1.1.</b>	Variables antropomètriques i bioquímiques dels subjectes Estudiats (Resultats SP-D).	<b>184</b>
<b>Taula 4.1.2.</b>	Correlació entre l'SP-D circulant i variables bioquímiques (Resultats SP-D).	<b>189</b>
<b>Taula 4.1.3.</b>	Polimorfisme Met <sup>11</sup> Thr del gen de l'SP-D i variables metabòliques (Resultats SP-D).	<b>195</b>
<b>Taula 4.1.4.</b>	Polimorfisme Met <sup>11</sup> Thr del gen de l'SP-D en la replicació de l'estudi (Resultats SP-D)	<b>199</b>
<b>Taula 4.1.5.</b>	Estudi dels efectes del salicilat sobre l'SP-D circulant en subjectes obesos (Resultats SP-D).	<b>200</b>
<b>Taula 4.2.1.</b>	Variables antropomètriques i bioquímiques dels subjectes no fumadors estudiats (Resultats SP-A)	<b>209</b>
<b>Taula 4.2.2.</b>	Correlació entre l'SP-A circulant i variables bioquímiques en subjectes o fumadors (Resultats SP-A)	<b>214</b>
<b>Taula 4.2.3.</b>	Anàlisi de regressió lineal múltiple amb l'SP-A sèrica com a variables dependent en subjectes no fumadors (Resultats SP-A)	<b>217</b>
<b>Taula 4.3.1.</b>	Variables antropomètriques i bioquímiques dels subjectes estudiats (Resultats defensines)	<b>220</b>
<b>Taula 4.3.2.</b>	Variables antropomètriques i bioquímiques segons els quartils (rangs de concentració) de les DEFA 1-3 dels subjectes a estudiar (Resultats defensines)	<b>222</b>
<b>Taula 4.3.3.</b>	Anàlisi de regressió múltiple de les DEFA 1-3 plasmàtiques com a variable depenent en subjectes aparentment sans (Resultats defensines)	<b>228</b>
<b>Taula 4.3.4.</b>	Anàlisi de regressió múltiple del colesterol LDL i la vasodilatació endoteliindependent com a variables dependents en subjectes aparentment sans (Resultats defensines)	<b>229</b>

<b>Taula 4.4.1.</b>	Variables clíniques i de laboratori dels individus no diabètics (Resultats Visfatina).	<b>231</b>
<b>Taula 4.4.2.</b>	Variables clíniques i de laboratori de pacients diabètics (Resultats Visfatina).	<b>232</b>
<b>Taula 4.4.3.</b>	Anàlisi de regressió múltiple de visfatina en sèrum com a variable dependent en homes tolerants a la glucosa (Resultats visfatina).	<b>234</b>

LLISTAT D'ABREVIACIONS

<b>A</b>	adenina
<b>Aa</b>	aminoàcid
<b>ACTH</b>	hormona adrenocorticotròpica
<b>ADIPOQ</b>	gen de l'adiponectina
<b>ADN</b>	àcid desoxiribonucleic
<b>ADNc</b>	àcid desoxiribonucleic complementari
<b>AHT</b>	hipertensió arterial
<b>AIRg</b>	resposta aguda de la insulina a la glucosa
<b>Akt</b>	proteïna quinasa B (PKB)
<b>Ala</b>	alanina
<b>ALI</b>	malaltia pulmonar aguda
<b>AMPC</b>	3,5-adenosin monofosfat cíclic
<b>AP-1</b>	factor de transcripció AP-1
<b>APOA2</b>	apolipoproteïna A-II
<b>ARDS</b>	síndrome d'insuficiència respiratòria aguda
<b>ARN</b>	àcid ribonucleic
<b>ARNases</b>	proteïnes que degraden (lisen) l'ARN
<b>ARNm</b>	àcid ribonucleic missatger
<b>Asn</b>	asparagina
<b>ATP</b>	adenosinatrifosfat
<b>ATPasa</b>	adenosinatrifosfatasa
<b>bp</b>	parells de bases
<b>β-ark</b>	receptor quinasa betaadrenèrgic
<b>B-Myb</b>	factor de transcripció
<b>BPI</b>	proteïna inductora de la permeabilitat
<b>C</b>	citocina
<b>Ca</b>	calci
<b>CCL20 (LARC)</b>	<i>chemokine (C-C motif) ligand 20 (liver and activation-regulated chemokin)</i>
<b>CCR6</b>	<i>chemokine (C-C motif) receptor 6</i>
<b>C/EBP</b>	proteïna d'unió al cebador CAAT
<b>CD14</b>	<i>cluster differentiation 14</i>
<b>c-Fos i c-Jun</b>	oncògens
<b>CHD</b>	malaltia coronària cardíaca
<b>CI</b>	interval de confiança
<b>CLR</b>	regió de col·lagen
<b>CMV</b>	citomegalovirus
<b>cpm</b>	<i>counts per minute</i>
<b>CRD</b>	domini de reconeixement de carbohidrat
<b>CRE</b>	element de resposta a l'AMP cíclic
<b>CRT</b>	calreticulina
<b>CSF</b>	factor estimulator de colònies
<b>CT</b>	cicle umbral
<b>CTL</b>	lectines tipus C
<b>CV</b>	coeficient de variació
<b>CVD</b>	malaltia cardiovascular
<b>CXCR4</b>	receptor 4 de quimioquines-CXC
<b>DC</b>	cèl·lules dendrítiques
<b>DCI</b>	AMPc + IBMx + Dexametasona
<b>DEFA</b>	gen de les α-defensines (DEFA1, DEFA2, ...)
<b>DEFB</b>	gen de les β-defensines (DEFB1, DEFB2,...)
<b>Derp</b>	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
<b>dl</b>	decilitre

<b>DM 1</b>	diabetis mellitus tipus 1
<b>DM 2</b>	diabetis mellitus tipus 2
<b>DMSO</b>	dimetil sulfòxid
<b>dNTP</b>	<i>Deoxyribonucleotide triphosphate</i>
<b>EIV</b>	vasodilatació endoteliindependent
<b>ELISA</b>	anàlisi d'immunoabsorció lligada als enzims
<b>EDTA</b>	àcid etildiamintetracètic
<b>ENPP1</b>	<i>ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1</i>
<b>FABP</b>	proteïna d'unió a àcids grassos
<b>FBS</b>	sèrum fetal boví
<b>FFA</b>	àcids grassos
<b>FFAR1/GPR40</b>	<i>free fat acid receptor 1/ G-protein coupled receptor 40</i>
<b>FGFR1</b>	receptor 1 del factor de creixement de fibroblasts
<b>FPG</b>	concentració plasmàtica de glucosa en dejú
<b>FSIGT o</b>	test de tolerància a la glucosa amb obtenció freqüent de mostres venoses
<b>FSIVGTT</b>	
<b>g</b>	gram
<b>G</b>	guanina
<b>GATA6</b>	factor de transcripció
<b>GCK</b>	glucoquinasa
<b>GL</b>	glicolípid
<b>GLP1</b>	<i>glucagon like peptide-1</i>
<b>GLUT</b>	transportador de glucosa
<b>Gly</b>	glicina
<b>GMPc</b>	guanosina monofosfat cíclic
<b>gp</b>	glicoproteïna (gp-340, gpA, etc...)
<b>GPCR</b>	<i>G-protein-couple receptors</i>
<b>Grb2</b>	proteïna 2 d'unió al receptor del factor de creixement
<b>GRE</b>	element de resposta a glucocorticoides
<b>h</b>	hores
<b>H441</b>	línia de cèl·lules epitelials d'adenocarcinoma pulmonar humà
<b>HA</b>	hemaglutinina
<b>HbA1c</b>	fracció 1c de l'hemoglobina glucosilada
<b>HBD</b>	betadefensines humanes
<b>HD</b>	alfadefensines
<b>HDL</b>	lipoproteïnes d'alta densitat
<b>HEPES</b>	<i>(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazi-neethanesulfonic acid)</i>
<b>HepG2</b>	hepatòcits epitelials de carcinoma humà
<b>HIV</b>	virus de la SIDA o virus de la immunodeficiència humana
<b>HL</b>	lipasa endotelial hepàtica
<b>HLA-A3</b>	<i>human leukocytes antigen A3</i>
<b>HNF</b>	factor nuclear d'hepatòcits
<b>HNP</b>	defensines dels neutròfils humans (alfadefensines)
<b>HOMA</b>	avaluació amb el model homeostàtic ( <i>homeostasis model assessment</i> )
<b>HSPG</b>	<i>heparan sulphate proteoglycan</i>
<b>HSV</b>	virus herpes simple
<b>IAV</b>	virus influença A
<b>IBMx</b>	3-Isobutil-1-metilxantina
<b>ICAM-1</b>	molècula d'adhesió cel·lular 1
<b>IFG</b>	intolerància a la glucosa en dejú ( <i>impaired fasting glucose</i> )
<b>IFN-γ</b>	interferó gamma
<b>IgE</b>	immunoglobulina E
<b>IGF</b>	factor de creixement insulínic
<b>IGF-IR</b>	receptor 1 del factor de creixement tipus insulínic
<b>IgG</b>	immunoglobulina G
<b>IGT</b>	intolerància a la glucosa
<b>IKB</b>	proteïnes inhibidores de NF-kB
<b>IkBa</b>	Ikappa b-alfa (subunitat inhibidora del NF-kappa B)
<b>IKK</b>	quinasa NF-kB (cinasa del factor nuclear kB)
<b>IL</b>	interleuquina (IL-1, IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-6, IL-18, etc...)

<b>IMC</b>	índex de massa corporal
<b>INF<math>\gamma</math></b>	interferó gamma
<b>IP<sub>3</sub></b>	inositol trifosfat.
<b>IPF-1</b>	factor 1 del promotor de la insulina
<b>IRAK</b>	<i>IL-1 receptor associated kinase</i>
<b>IRF3</b>	factor 3 regulador d'interferó
<b>IRS-1</b>	substrat-1 del receptor de la insulina (IRS-2: substrat 2 del receptor de la insulina)
<b>JNK</b>	enzim quinasa N-terminal Jun
<b>IRS-2</b>	substrat-2 del receptor de la insulina
<b>Jun</b>	gens reguladors (protooncogèn: JunB i JunD)
<b>KCNJ9</b>	<i>potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 9</i>
<b>kDa</b>	kiloDalton
<b>l</b>	litre
<b>kg</b>	kilograms
<b>LBP</b>	proteïna d'unió a lipopolisacàrids
<b>LCAT</b>	colesterol aciltransferasa
<b>LD<sub>50</sub></b>	dosi semiletal (dosi d'una substància que resulta mortal per la meitat d'un conjunt d'animals/bacteris de prova)
<b>LDL</b>	lipoproteïna de baixa densitat
<b>LDLR</b>	receptor de les lipoproteïnes de baixa densitat
<b>LPL</b>	lipoproteïna lipasa
<b>LPS</b>	lipopolisacàrid
<b>LTB<sub>4</sub></b>	leucotriè B <sub>4</sub>
<b>LXR</b>	receptor X del fetge
<b>MAPK</b>	proteïnes cinases activades per mitògens
<b>MCP-1</b>	proteïna 1 quimiotàctica de monòcits
<b>ME (o <math>\beta</math>ME)</b>	2-Mercaptoetanol o $\beta$ -mercaptoetanol
<b>Met</b>	metionina
<b>mg</b>	mil·ligrams
<b>MGB</b>	<i>minor groove binder</i>
<b>MIC</b>	concentració mínima inhibidòria
<b>MIP-<math>\alpha</math></b>	proteïna $\alpha$ inflamatòria de macròfags
<b>ml</b>	mil·lilitre
<b>mm</b>	mil·límetres
<b>mM</b>	mil·limolar
<b>mmol/l</b>	mil·limolar/litre
<b>MMP</b>	metal·loproteases
<b>MODY</b>	un tipus de diabetis monogènica ( <i>maturity-onset diabetes of the young</i> )
<b>MyD88</b>	<i>myeloid differentiation primary response gene 88</i>
<b>NAD</b>	<i>nicotinamide adenine dinucleotide</i>
<b>Nampt</b>	nicotinamida fosforibosiltransferasa (eNampt: extracel·lular, iNampt: intracel·lular)
<b>NCBI</b>	Centre Nacional per la Informació Biotecnològica
<b>NeuroD1</b>	<i>neurogenic differentiation 1</i>
<b>NFAT</b>	factor nuclear d'activació de cèl·lules T
<b>NF-IL-6</b>	factor nuclear d'interleuquina 6
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	factor nuclear $\kappa$ B
<b>ng</b>	nanogram/microlitre
<b>NGT</b>	tolerància a la glucosa normal
<b>nm</b>	nanòmetres
<b>nM</b>	nanomolar
<b>NMN</b>	<i>nicotinamide mononucleotide</i>
<b>NO</b>	òxid nítric
<b>no-DM</b>	no diabètics
<b>OGTT</b>	test oral de tolerància a la glucosa
<b>PAI-1</b>	inhibidor 1 de l'activador del plasminogen
<b>PAMP</b>	molècula associada a patògens
<b>PBEF</b>	factor desencadenant de colònies de cèl·lules pre-B ( <i>pre-B-cell colony enhancing factor</i> )
<b>PBEF1</b>	gen de la visfatina
<b>PBMC</b>	cèl·lules mononucleades de la sang perifèrica
<b>PBS</b>	solució tampó fosfatada

<b>PCR</b>	proteïna C reactiva
<b>PCR</b>	reacció en cadena de la polimerasa
<b>PCR-RT</b>	reacció en cadena de la polimerasa a temps real
<b>Pdx-1</b>	<i>homeobox-1</i> pancreàtic i duodenal
<b>PEA3</b>	factor de transcripció
<b>pg</b>	picograms
<b>PI</b>	fosfatidilinositol
<b>PI3K</b>	3 cinasa fosfatidilinositol ( <i>phosphatidylinositol 3-inase</i> )
<b>PIV-3</b>	virus parainfluença humana tipus 3
<b>PKB</b>	proteïna cinasa B
<b>PKC</b>	proteïna cinasa C
<b>PMA</b>	<i>phorbol-12-myristate-13-acetate</i>
<b>PPAR-<math>\gamma</math></b>	receptor $\gamma$ de l'activador de la proliferació dels peroxisomes
<b>RAGE</b>	<i>receptors advanced glycation endproducts</i>
<b>RDS</b>	síndrome d'insuficiència respiratòria
<b>RE</b>	reticle endoplasmàtic
<b>RI</b>	receptor de la insulina
<b>RI</b>	resistència a la insulina
<b>ROS</b>	<i>reactive oxygen species</i>
<b>rpm</b>	revolucions per minut
<b>SD</b>	desviació estàndard
<b>SE</b>	error estàndard
<b>Ser</b>	serina
<b>Sg o SG</b>	efectivitat de la glucosa
<b>SFTPD</b>	gen de l'SP-D
<b>Shc</b>	proteïna de col·lagen homòloga a Src
<b>S<sub>I</sub> o SI</b>	sensibilitat a la insulina
<b>SIRP<math>\alpha</math></b>	proteïna $\alpha$ reguladora de senyals
<b>SLC30A8</b>	<i>solute carrier family 30 (zinc transporter) member 8</i>
<b>SLPI</b>	inhibidor de proteases de leucòcits de secreció
<b>SNP</b>	polimorfismes d'un sol nucleòtid
<b>SP</b>	proteïna surfactant (SP-A, SP-B, SP-C, SP-D)
<b>Sp-1</b>	factor de transcripció
<b>SRC-1</b>	coactivador 1 del receptor d'esteroides
<b>SRI</b>	síndrome de resistència a la insulina
<b>T</b>	tímida
<b>TAD</b>	pressió sanguínia diastòlica
<b>TAS</b>	pressió sanguínia sistòlica
<b>TBE</b>	<i>tris-borat EDTA</i>
<b>TCA</b>	àcid tricloracètic
<b>TCF7L2</b>	<i>transcription factor 7-like 2</i>
<b>TG</b>	triglicèrids
<b>TGF-<math>\beta</math>1</b>	<i>transforming growth factor <math>\beta</math>1</i>
<b>Th</b>	cèl·lules T col·laboradores
<b>Thr</b>	treonina
<b>TLR</b>	<i>Toll-like receptor</i>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	factor de necrosis tumoral alfa
<b>TNFR1</b>	receptor 1 del factor de necrosi tumoral
<b>TNFR2</b>	receptor 2 del factor de necrosi tumoral
<b>TNFR1s</b>	receptor 1 soluble del factor de necrosi tumoral
<b>TNFR2s</b>	receptor 2 soluble del factor de necrosi tumoral
<b>TPA</b>	èster de forbol ( <i>2-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate</i> )
<b>t-PA</b>	activador del plasminogen tissular ( <i>tissue plasminogen activator</i> )
<b>TRAF6</b>	factor 6 associat al receptor de TNF
<b>TTF-1</b>	factor de transcripció de la tiroïdes
<b>Tyr</b>	tirosina
<b>U/kg</b>	unitats/kilogram
<b>USF-1</b>	<i>upstream transcription factor-1</i>
<b>UTR</b>	regió no codificant
<b>UV</b>	ultraviolats

<b>VCAM-1</b>	molècula d'adhesió cel·lular vascular 1
<b>VLDL</b>	lipoproteïna de molt baixa densitat
<b>VSV</b>	virus d'estomatitis vesicular
<b>WHR</b>	índex cintura-maluc
<b>µl</b>	microlitre



---

DEFINICIONS I CONCEPTES MÈDICS I GENÈTICS

---

**A549:** és una línia cel·lular de carcinoma de pulmó humà procedent d'un individu mascle caucasià de 58 anys. Aquestes cèl·lules provenen de l'epiteli basal alveolar i tenen característiques típiques dels pneumòcits tipus II pulmonars. Aquesta línia cel·lular va ser obtinguda al 1973 per Giard DJ. i col·laboradors.

Aquestes cèl·lules poden sintetitzar lecitina mitjançant la via de la *cytidine diphosphocholine*. Algunes cèl·lules poden contenir cossos d'inclusió tot i que se sap que no presenten patògens humans.

**AL·LEL:** és una de les formes alternatives d'un mateix gen que ocupa un locus. En el cas d'un SNP, un al·lel és una de les dues formes alternatives.

**AMPc (3,5-adenosina monofosfatada cíclica):** és un nucleòtid cíclic format a partir de l'adenosinatrifosfat per acció de l'adenilciclase. Aquest compost cíclic, conegut com a missatger intracel·lular, participa en l'acció de les catecolamines, de la vasopressina, de l'hormona adrenocorticotropa i de moltes altres hormones. L'AMPc modula l'expressió d'alguns gens.

La majoria dels efectes de l'AMPc sobre el funcionament cel·lular estan mediatos a través de la fosforilació proteica.

Fins ara els mecanismes més importants per mitjà dels quals l'AMPc exerceix els seus efectes fisiològics és a través de l'activació de la proteïna quinasa dependent d'AMPc.

**ARTERIOSCLEROSI o ATEROSCLEROSI:** malaltia que es caracteritza per la formació d'una placa d'ateroma que es forma a la paret de les artèries a causa de l'acumulació de lípids. Aquests dipòsits solen provocar complicacions amb diferents graus de trombosi, necrosi i ulceracions, fins a provocar l'oclusió del vas (isquèmia coronària, infart), aneurismes o hemorràgies. L'aterosclerosi està relacionada amb l'edat, el tabaquisme, la diabetis, la tensió emocional, la hipertensió, l'obesitat i la inactivitat física.

**BPI (proteïna inductora de la permeabilitat bacteriana):** és una proteïna que pertany a una família de proteïnes molt ben conservades que transfereixen lípids (dins les quals s'inclou l'LBP). La BPI s'expressa, principalment, als neutròfils amb una forta activitat antimicrobiana contra bacteris gramnegatius i amb activitat neutralitzadora d'endotoxines. La BPI promou la mort bacteriana intracel·lular i extracel·lular.

El gen que codifica la BPI està localitzat en el cromosoma 20 en tàndem amb el gen de l'LBP entre q11.23 i q22 (Schultz H i Weiss JP, 2007).

**CD14:** és una proteïna de 53 kDa glicosilfosfatidilinositolada associada a membrana, expressada a la superfície de les cèl·lules, especialment, els macròfags.

El CD14 actua com a coreceptor (conjuntament amb el TLR4 (*toll-like receptor 4*) i l'MD-2) per detectar els lipopolisacàrids (LPS) dels bacteris (Wright SD i col., 1990).

El fetge i els monòcits secreten en baixes concentracions una forma soluble de CD14 (sCD14) per conferir resposta als lipopolisacàrids a cèl·lules que no expressen el CD14 (Haziot A. i col., 1993 i Pugin J. i col., 1994). Els LPS s'uneixen a proteïnes sèriques com l'LBP, la qual facilita la unió dels LPS al CD14 (Hailman E. i col., 1994). Quan els LPS s'uneixen al CD14 que expressen els monòcits o neutròfils, les cèl·lules s'activen i

produeixen citoquines com el TNF i regulen les vies de senyalització de molècules de superfície de les cèl·lules, com les molècules d'adhesió (Haziot A. i col., 1993; i Pugin J. i col., 1994).

**COTININA (1-metil-3-(2-piridinil)-2-pirrolidinona, C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O):** és un metabòlit de la nicotina i s'utilitza per mesurar l'exposició al fum del tabac activa i l'exposició passiva.

**CREATININA:** és un metabòlit nitrogenat producte de la degradació de la creatina per deshidratació. La creatinina es transporta des dels músculs per mitjà de la sang cap al ronyó. Els ronyons filtren la majoria de la creatinina i l'eliminen en l'orina.

Malgrat que és una substància de rebuig, la creatinina és una prova diagnòstica essencial, ja que la seva concentració en sang indica de forma força fiable l'estat de la funció renal. Si els ronyons no funcionen bé, no eliminen bé la creatinina i, per tant, s'acumula a la sang. Per aquest motiu la creatinina figura en les anàlisis de sang que es realitzen habitualment. Els valors normals de creatinina en sang són d'entre 0.6 i 1.2 mg/dl en els homes adults i d'entre 0.5 i 1.1 mg/dl en dones adultes.

**DCI (AMPc + IBMx + Dexametasona):** és un producte format per AMPc, IBMx i dexametasona. Segons Yang Cao MD. i col·laboradors, el DCI restaura l'expressió de l'SP-D en cultius de cèl·lules A549 al quart dia d'haver sembrat les cèl·lules. Sense DCI l'expressió de SP-D desapareix a les 24h del sembrat (Yang Cao MD. i col., 2003; i Bates SR. i col., 2001). Per tant, el DCI preserva les característiques fenotípiques de les cèl·lules epitelials tipus II.

**DESEQUILIBRI DE LLIGAMENT:** és la no independència d'al·lels concrets en locus diferents.

**DEXAMETASONA:** és un agent glucocorticoide antiinflamatori. La dexametasona inhibeix la inducció de la sintasa d'òxid nítric. La dexametasona també activa l'expressió d'alguns gens i estimula la diferenciació cel·lular, i exerceix un efecte protector que augmenta la concentració cel·lular per unitat de temps respecte cultius sense dexametasona.

**DMSO (Dimetil sulfòxid):** és un compost químic amb fórmula  $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$ . És un solvent polar apròtic que dissol tant compostos polars com apolars. La seva polaritat accelera reaccions en estats de càrrega transitòria. El DMSO té la propietat de penetrar a la pell amb molta facilitat.

El DMSO prové de la indústria de la fusta i s'està utilitzant com a solvent comercial des de 1953.

El DMSO té habilitat per travessar les membranes sense causar danys significatius. A més, pot fer que altres fàrmacs o molècules travessin les membranes com el sulfat de morfina, la penicil·lina, els esteroides, la cortisona i la insulina. El DMSO també redueix la inflamació mitjançant varis mecanismes. És antioxidant i un netejador de radicals lliures.

**H441:** és una línia cel·lular epitelial d'adenocarcinoma de pulmó humà. Aquestes cèl·lules s'utilitzen normalment com a model de les cèl·lules Clara de pulmó, tot i que tenen característiques típiques dels pneumòcits tipus II. Està descrit que aquestes cèl·lules produeixen ARNm i proteïna de SP-A i SP-B (glicoproteïnes associades al

surfactant pulmonar). La regulació hormonal de l'expressió dels gens de SP-A i SP-B en les cèl·lules H441 és similar a l'observada en els pneumòcits tipus II diferenciats dels explants de pulmó humà fetal.

**HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazi-neethanesulfonic acid):** és un agent tampó químic orgànic que és molt utilitzat en cultius cel·lulars per mantenir el pH fisiològic. L'HEPES és més convenient per esmorteir o tamponar en el rang fisiològic de pH de 7.2-7.6.

**IBMx (3-Isobutil-1-metilxantina):** és un potent inhibidor no específic de fosfodiesterases que també té activitat agonista per l'adenosina. L'IBMx ajuda a la formació d'AMPc mitjançant la degradació del GMPc i activa les proteïnes quinases reguladores de nucleòtids cíclics.

L'IBMx s'utilitza en cultius cel·lulars per estabilitzar les concentracions intracel·lulars d'AMPc mitjançant la inhibició de la degradació de l'AMPc mitjançant fosfodiesterases.

**IGT/IFG/FPG/OGTT:** definició de les mesures actuals per determinar aquests factors.

**IGT:** intolerància a la glucosa (en estudi de corbes de glucosa, es mira al cap de 2 hores normalment).

**IFG:** intolerància a la glucosa en dejú.

Els pacients amb IGT i/o IFG es defineixen perquè tenen concentracions de glucosa en plasma  $\geq 100$ mg/dl (glucosa en dejú, FPG) (5.6 mmol/l) però  $< 126$ mg/dl (7.0 mmol/l); o bé en el test oral de tolerància a la glucosa (OGTT:

és la valoració dels nivells de glucosa després de prendre 75g de glucosa oral) presenten uns valors  $\geq 140$ mg/dl (7.8 mmol/l) però  $< 200$ mg/dl (11.1 mmol/l).

Així es poden classificar els pacients segons aquests valors en:

- FPG  $< 100$  mg/dl (5.6 mmol/l) = tolerància a la glucosa normal en dejú.
- FPG 100-125 mg/dl (5.6-6.9 mmol/l) = IFG, intolerància a la glucosa en dejú.
- FPG  $\geq 126$  mg/dl (7.0 mmol/l) = diagnòstic provisional de diabetis.

En cas de fer-se un OGTT els valors corresponents serien els següents:

- 2 hores després de prendre la glucosa  $< 140$ mg/dl (7.8 mmol/l) = tolerància normal a la glucosa.
- 2 hores després de la presa de la glucosa 140-199 mg/dl (7.8-11.1 mmol/l) = intolerància a la glucosa: IGT.
- 2 hores després de la dosi de glucosa  $\geq 200$ mg/dl (11.1 mmol/l) = diagnòstic provisional de diabetis.

(American Diabetes Association, 2008a i 2008b)

**IMC: ÍNDEX DE MASSA CORPORAL:** es calcula a partir de la fórmula:

$\text{Pes}/(\text{alçada})^2$ . L'alçada calculada en metres i el pes en quilograms.

**LBP (proteïna d'unió a lipopolisacàrids):** és una proteïna de fase aguda que es produeix durant una infecció de bacteris gramnegatius. Els bacteris gramnegatius presenten lipopolisacàrids (LPS) exposats a la part externa de la paret cel·lular i els humans responen ràpidament davant aquesta presència sèrica de LPS. L'LBP i altres reactants de fase aguda (com la BPI) s'uneixen als LPS amb molta afinitat. L'LBP es sintetitza al fetge durant la fase aguda de les infeccions i s'encarrega de les funcions de portador de LPS i control de la resposta dels monòcits dependents de LPS.

**LOCUS:** és la localització física d'un al·lel en el cromosoma.

**MBL (lectina d'unió a mannosos o proteïna d'unió a mannosos (MBP)):** és una proteïna plasmàtica calcidependent que pertany a la família de les col·lectines (perquè té una regió semblant al col·lagen i una regió *lectina*). L'MBL té un paper important en la resposta immunològica innata: s'uneix als residus de mannosa, fucosa i altres carbohidrats que es troben a la superfície d'alguns patògens (virus, bacteris, fongs, protozous). Les seves funcions principals són opsonitzar i activar el sistema del complement del sistema immunitari. El gen MBL2 del cromosoma 10 humà produeix l'MBL (Gupta G i Surolia A, 2007).

**2-MERCAPTOETANOL (o  $\beta$ -mercaptoetanol, ME o  $\beta$ ME):** és un compost químic de fórmula  $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{SH}$ . És un híbrid entre l'etilenglicol i el 1,2-etaneditiol. El ME s'utilitza per reduir els enllaços disulfur, per tant, permet la separació de les subunitats constituents de les proteïnes polimèriques i el desplegament de les monomèriques. Per aquest motiu, el ME és útil en els primers passos de lisi cel·lular del procés d'extracció d'ARNm o d'ADN. El ME també actua com a antioxidant biològic ja que neteja els radicals hidroxil.

**PIRUVAT SÒDIC:** el piruvat és un alfacetoàcid natural que metabòlicament es troba al final de la via glicolítica i que es transforma en àcid làctic, el qual és un alfafidroxidàcid. El piruvat sòdic és essencial en la conversió i regeneració de l'ATP. També és important la seva activitat intrínseca ja que augmenta el metabolisme cel·lular, l'activitat estimuladora fibroblàstica i la síntesi de col·lagen subseqüent.

L'activitat queratinocítica és una característica tant dels alfa-hidroxiàcids (lactat) com dels alfacetoàcids (piruvat).

En els cultius cel·lulars el piruvat sòdic s'utilitza com a font d'accessibilitat fàcil de carbohidrats per les cèl·lules. A més a més, està involucrat en el metabolisme dels aminoàcids i inicia el cicle de Krebs.

**PPAR- $\gamma$  (receptor  $\gamma$  de l'activador de la proliferació dels peroxisomes):** els PPAR són una família de proteïnes amb funció de receptor nuclear que controlen l'activitat de xarxes genètiques cel·lulars. El PPAR- $\gamma$  participa en un mecanisme involucrat en la regulació de despesa energètica, la sensibilitat a la insulina, el metabolisme de la glucosa i la distribució del greix entre el fetge i el greix perifèric (Benson S. i col., 2004; i Clasen R. i col., 2005).

**QUINASA (o cinasa):** és un tipus d'enzim que transfereix grups fosfat des de l'ATP a un substrat específic o diana. El procés s'anomena fosforilació. La diana pot activar-se o inactivar-se mitjançant la fosforilació. Totes les quinases necessiten un ió metàl·lic divalent com el  $Mg^{2+}$  o el  $Mn^{2+}$  per transferir el grup fosfat. Aquests enzims són activats per l'AMP cíclic, que catalitza la fosforilació de determinades proteïnes.

Les quinases estan implicades en els mecanismes de senyalització cel·lular.

**ROSIGLITAZONA:** és un tipus de *thiazolidinedione*. És un agent antidiabètic que actua principalment fent augmentar la sensibilitat a la insulina. La rosiglitazona millora el control glicèmic amb la reducció de les concentracions d'insulina circulant i la utilització de la glucosa perifèrica. Aquest fàrmac millora la sensibilitat a la insulina en

múscul i teixit adipós i inhibeix la gluconeogènesi hepàtica. La rosiglitazona no estimula la secreció d'insulina i, administrada sola, no causa hipoglucèmia.

La rosiglitazona és altament selectiva i és un potent agonista pel PPAR $\gamma$ . En humans, els receptors de PPAR es troben en teixits on actua la insulina, com el teixit adipós, el múscul esquelètic i el fetge. L'activació dels receptors nuclears de PPAR $\gamma$  regulen la transcripció dels gens sensibles a la insulina involucrats en el control de la producció, transport i utilització de la glucosa. Els gens sensibles a PPAR $\gamma$  també participen en la regulació del metabolisme dels àcids grassos.

La rosiglitazona és metabolitzada al fetge a metabòlits inactius via la N-desmetilació, la hidroxilació, i la conjugació amb sulfat i àcid glucurònic. S'ha demostrat, *in vitro*, que la rosiglitazona és majoritàriament metabolitzada per CYP2C8 (Citocrom P450 isoenzim 2C8), i en menor grau pel CYP2C9 (Citocrom P450 isoenzim 2C9).

**TNFR1 I TNFR2:** el TNFR1 (TBPI o p55) i el TNFR2 (TBPII o p75) són els dos receptors del factor de necrosi tumoral que es troben a la superfície de moltes cèl·lules. Diferents processos modulen la seva presència. La IL-2 i l'activació dels limfòcits T incrementa la presència tant de TNFR1 com de TNFR2. La maduració dels macròfags i la presència d'activadors de proteïnes quinases també incrementa la seva presència.

Els TNFRs disminueixen en presència de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, d'epinefrina, d'insulina i de somatostatina.

Els dos receptors són capaços d'unir-se a TNF- $\alpha$  i TNF- $\beta$ . El TNFR1 té 55 kDa i TNFR2 té 75 kDa i són les formes presents en monòcits.

Les formes solubles dels receptors (sTNFR1 i sTNFR2), provinents de la membrana plasmàtica, es troben també en orina, plasma i sobrenedant de cultius. La seva presència s'ha trobat en el sèrum de pacients amb càncer, deficiència renal crònica i en pacients

d'ARDS (síndrome de dificultat respiratòria aguda). Els receptors solubles del TNF són també marcadors putatius de la progressió de la infecció per VIH. Els sTNFR també es correlacionen amb parasitèmia i amb severitat de la malària. Aquestes formes solubles del receptor s'uneixen perfectament al TNF circulant i, per tant, inhibeixen l'acció biològica del TNF. En algunes condicions, aquestes formes solubles són capaces de protegir el TNF i incrementar així la seva vida mitja.

**TRIFUSAL:** és un fàrmac antiagregant plaquetari. El trifusal és un potent inhibidor de la biosíntesi de tromboxà (TXA<sub>2</sub>). El principal metabòlit del trifusal és l'àcid 2-hidroxí-4-trifluorometilbenzòic (HTB) amb activitat antiagregant plaquetària. Aquest no altera la biosíntesi de prostaciclina PGI<sub>2</sub>, el factor antiagregant més potent que es coneix. El trifusal, *in vitro*, presenta la capacitat d'inhibir l'acció del factor nuclear de transcripció NF-κB. L'NF-κB indueix l'activació de la producció de diferents molècules relacionades en processos inflamatoris. Així el trifusal actuaria d'antiinflamatori.

**TRIPSINA:** és una peptidasa que trenca els enllaços de les proteïnes mitjançant la hidròlisi per formar pèptids o aminoàcids de mida inferior. Aquesta proteasa, descoberta per Kühne, és produïda pel pàncrees i secretada a duodè, on és crucial per la digestió. Aquest enzim s'utilitza en el tractament de cultius cel·lulars per separar les cèl·lules del suport de plàstic per tal de recollir-les i trencar les unions intercel·lulars.

# 1. INTRODUCCIÓ



## **1.1. LA DIABETIS**

La Diabetis Mellitus és un conjunt d'entitats metabòliques caracteritzades per la hiperglucèmia crònica causada per defectes en la secreció d'insulina, defectes en l'acció de la insulina o ambdues causes. La hiperglucèmia de la diabetis està associada a l'alteració de varis òrgans i sistemes, especialment els ulls, els ronyons, el sistema nerviós, el cor i els vasos sanguinis.

És una malaltia que pot ser asimptomàtica amb conseqüències molt greus.

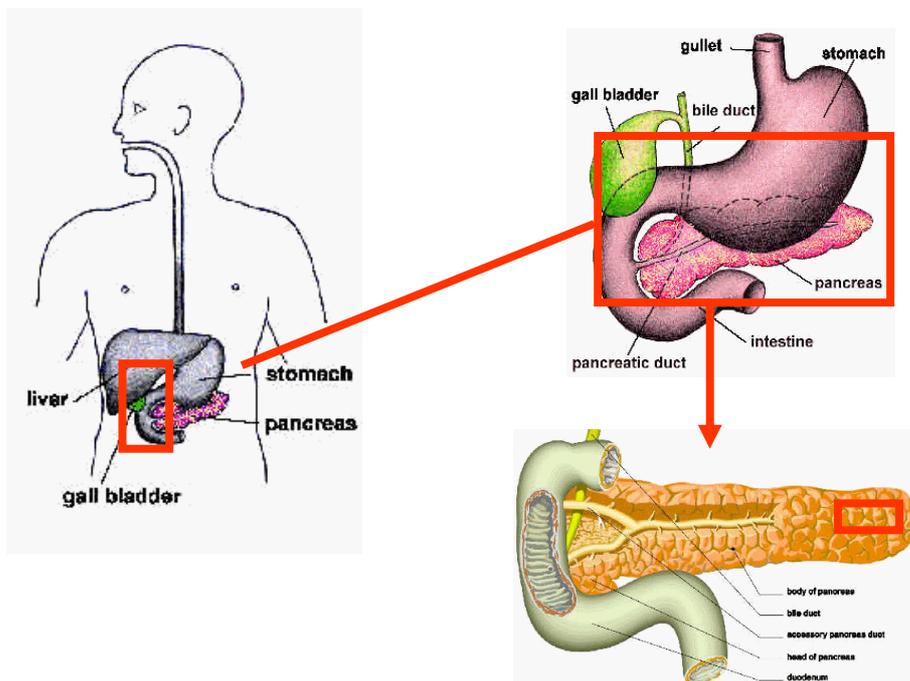
Cal destacar que es tracta d'una entitat multifactorial ja que factors genètics, l'obesitat, l'envelliment, l'estrès, el sedentarisme, alguns fàrmacs que indueixen resistència a la insulina, etc... poden contribuir a desencadenar la malaltia.

### **Tipus de Diabetis**

Hi ha molts tipus de diabetis, però se'n destaquen principalment dos: la diabetis tipus 1 (DM 1) que apareix normalment a la infància i adolescència, i es pot controlar mitjançant l'administració d'insulina, tractament que s'ha de mantenir durant tota la vida del pacient (insulinodependent). Està originada per la destrucció autoimmunitària de les cèl·lules  $\beta$  del pàncrees, que normalment dóna una absoluta deficiència d'insulina (Figura 1.1.). Els marcadors de la destrucció immunitària de les cèl·lules  $\beta$  inclouen autoanticossos contra les cèl·lules dels illots, autoanticossos de la insulina, autoanticossos de la descarboxilasa de l'àcid glutàmic (GAD<sub>65</sub>), i autoanticossos de fosfatases de tirosines IA-2 i IA-2 $\beta$ . Els nivells de destrucció de les cèl·lules  $\beta$  varia segons els individus (sol ser ràpida en nadons i nens i lenta en adults) (*American Diabetes Association*, 2008).

La diabetis tipus 2 (DM 2) es sol diagnosticar a persones de més edat. És deguda a la insuficient síntesi d'insulina per part de les cèl·lules  $\beta$  pancreàtiques en relació a la seva acció perifèrica. Això és degut a que hi ha una resistència a l'acció de la insulina, sobretot en el teixit muscular, al fetge i als adipòcits, i es força la capacitat de les cèl·lules  $\beta$  per produir insulina. Tot i que hi ha diferents causes de la malaltia, aquesta no ve donada per la destrucció autoimmunitària de les cèl·lules  $\beta$ . Però la disfunció de les cèl·lules  $\beta$  és necessària per tal que aparegui la DM 2; ja que si hi ha resistència a la insulina i la cèl·lula  $\beta$  la compensa no hi haurà hiperglucèmia, només hiperinsulinèmia (Kasuga M., 2006). Aquest tipus de diabetis, malgrat que no requereix inicialment subministraments d'insulina (insulinoindependent), a mesura que avança la malaltia el pacient pot necessitar tractament amb insulina. Pot tardar temps a diagnosticar-se ja que la hiperglucèmia es desenvolupa gradualment. En el diagnòstic, aquests malalts poden tenir alhora elevades concentracions d'insulina a la sang i elevades concentracions de glucosa. Aquest tipus de diabetis té un component hereditari molt important demostrat en estudis de concordança entre bessons, tot i que la seva genètica és complexa i el seu coneixement és incomplet (*American Diabetes Association, 2008*).

## PÀNCREES HUMÀ



***Figura 1.1:*** Pàncrees humà. Wynn J., *Cell Physiology*.

Els pacients amb diabetis mellitus presenten un risc extraordinàriament elevat de patir arteriosclerosi i cardiopatia isquèmica; i la malaltia cardiovascular serà la primera causa de morbiditat i mortalitat en pacients diabètics (Ginsberg HN, 2000; Howard G. i col., 1996).

### **1.1.1. CRITERIS PER DIAGNOSTICAR LA DIABETIS MELLITUS**

Per diagnosticar la diabetis mellitus es tenen en compte els següents paràmetres.

1. Els símptomes de la hiperglucèmia (apartat 1.1.2.) i una concentració plasmàtica casual de glucosa  $\geq 200\text{mg/dl}$  ( $11.1\text{mmol/l}$ ). Casual es defineix com a algun moment del dia sense tenir en compte quan s'ha realitzat l'última ingesta.

o

2. Glucosa plasmàtica en dejú (FPG)  $\geq$  126mg/dl (7.0mmol/l). Per dejú s'entén el fet de no haver menjat durant les últimes 8 hores.

o

3. Durant un test oral de tolerància a la glucosa (OGTT), després de dues hores, uns valors de glucosa en plasma  $\geq$  200mg/dl (11.1mmol/l). El test s'hauria de realitzar tal i com descriu la *World Health Organization*, amb una ingestió de glucosa equivalent a 75g d'anhídrid de glucosa dissolta en aigua.

(American Diabetes Association, 2008 a i 2008b).

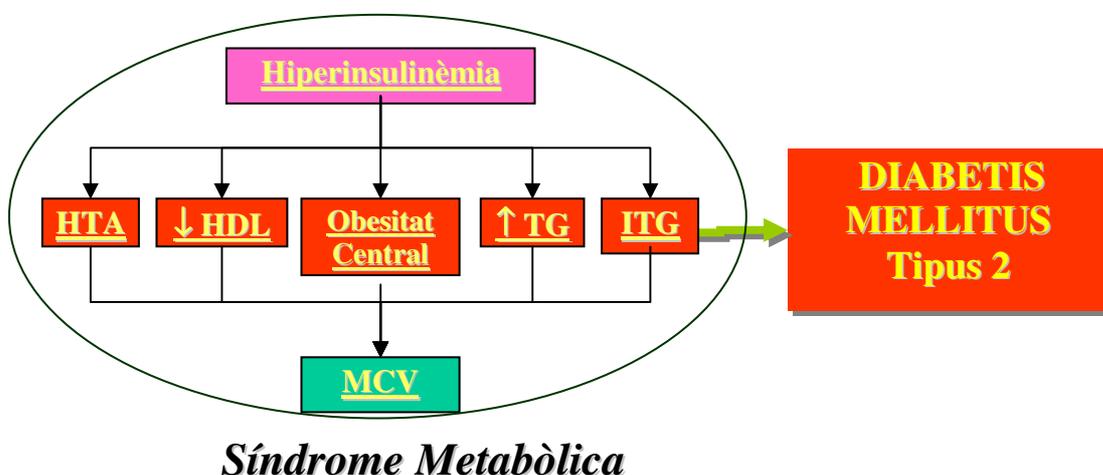
### **1.1.2. SIMPTOMATOLOGIA DE LA HIPERGLUCÈMIA**

Entre els principals símptomes de la hiperglucèmia s'inclou: la polidípsia (set exagerada o crònica), i la poliúria (volum d'orina excessiu). Aquest últim fet és degut a que la hiperglucèmia causa deshidratació de les cèl·lules ja que la glucosa travessa les membranes cel·lulars per difusió passiva i menys per transport actiu a través de receptors estimulat per la insulina; per tant, augmenta la pressió osmòtica extracel·lular produint la sortida d'aigua de la cèl·lula per igualar les concentracions extracel·lulars.

L'excés de glucosa en plasma s'elimina per l'orina. Això sol succeir quan la concentració sanguínia de glucosa supera els 180mg/dl.

## **1.2. LA SÍNDROME DE LA RESISTÈNCIA A LA INSULINA (SRI) O LA SÍNDROME METABÒLICA**

La resistència a la insulina (RI) és la inhabilitat relativa de la insulina de realitzar els seus efectes biològics usuals que sol exercir a les concentracions habituals en subjectes sans. La condició més comuna associada a la RI és l'obesitat i l'estil de vida sedentari. En els individus amb aquestes condicions s'esdevenen més freqüentment múltiples factors (hiperinsulinèmia, disglucèmia (intolerància a la glucosa), hipertrigliceridèmia (concentracions elevades de triglicèrids) i concentracions baixes de colesterol HDL, hipertensió arterial, trastorns de la coagulació i de la fibrinòlisi, arteriosclerosi i altres anormalitats metabòliques). Tots aquests factors estan associats a un augment del risc de desenvolupar DM 2 i problemes cardiovasculars i per referir-se a ells s'utilitzen els termes: *síndrome de la resistència a la insulina (SRI)*, *síndrome X* o *síndrome metabòlica* (Figura 1.2.) (Yki-Järvinen H, 2004).



**Figura 1.2.:** Esquema general de la síndrome metabòlica com a desencadenant de Diabetis Mellitus tipus 2. HTA: hipertensió arterial, MCV: malalties cardiovasculars, HDL: lipoproteïnes d'alta densitat, ITG: intolerància a la glucosa, TG: triglicèrids. *Festa A. i col., 2000.*

### **1.2.1. FACTORS ASSOCIATS A LA SRI**

Existeixen factors amb coneguda influència sobre la SRI, com l'edat i el grau relatiu d'obesitat (índex de massa corporal: IMC) (Yki-Jarvinen H., 1995). L'edat avançada sembla influenciar en el deteriorament de l'acció insulínica encara que aquest fet està en discussió (Imbeault P. i col., 2003). Com que el teixit muscular és el teixit prioritari d'emmagatzematge de glucosa estimulat per la insulina, la massa muscular és un altre factor a considerar (Yki-Jarvinen H, 1983). El sexe també contribueix a la variabilitat de la insulino-resistència. Les dones són més insulino-sensibles (Krotkiewski M. i col., 1983; Hale PJ. i col., 1985; i Nuutila P. i col., 1995), tot i que tenen un major

percentatge de greix corporal i una menor massa muscular que els homes. L'activitat física habitual és un altre modulador de l'acció de la insulina (la millora), mentre que l'exercici agut la deteriora. La capacitat aeròbica màxima presenta una bona correlació amb la sensibilitat a la insulina (Rosenthal M. i col., 1983).

Els factors associats a "l'estil de vida", com la ingesta de greixos saturats o la d'alcohol abundant, el tabaquisme, alguns nutrients o fàrmacs, etc., deterioren la sensibilitat a la insulina (Bouchard C. i col., 1990; Spiegelman BM i Flier JS, 2001; i Rankinen T. i col., 2002). També cal tenir en compte altres situacions fisiològiques, com la pubertat i la gestació (Moller DE i Flier JS, 1991), i patològiques, amb coneguda influència sobre la sensibilitat a la insulina com la insuficiència renal amb urèmia (Hager SR, 1989), la cirrosi hepàtica (Cavallo-Perin P. i col., 1985), la cetoacidosi diabètica (Moller DE i Flier JS, 1991) i les entitats que determinen hiperproducció d'insulina amb *down regulation* del receptor de la insulina (insulinoma) o la hiperproducció d'hormones contrareguladores com ara la síndrome de Cushing, l'acromegàlia, el feocromocitoma, el glucagonoma, la tirotoxicosi i l'estrès per febre o sèpsia (Moller DE i Flier JS, 1991). És probable que la insulino-resistència sigui el resultat de la interacció de diferents factors mediambientals i una complexa base genètica (Bouchard C. i col., 1990; Spiegelman BM i Flier JS, 2001; i Rankinen T. i col., 2002).

A continuació es fa una breu revisió d'alguns dels factors coneguts més importants associats a la SRI.

#### **1.2.1.1. Obesitat i distribució central (abdominal) del greix corporal**

La resistència a la insulina generalment augmenta en paral·lel amb l'increment del greix corporal. L'obesitat està associada al deteriorament de l'entrada de glucosa als teixits

per l'estímul de la insulina i pel defecte de l'habilitat de la insulina d'inhibir la producció endògena de glucosa i la lipòlisi al teixit adipós (Kolterman OG. i col., 1980; i Bonadonna RC. i col., 1990). Aquest defecte és més sever en els individus amb greix de distribució abdominal (androide) que en els que presenten obesitat ginecoide (distribució del greix a la part inferior del cos) (Yki-Järvinen H, 2004).

El greix omental (visceral) pot mobilitzar més àcids grassos no esterificats que els adipòcits subcutanis, probablement per un augment de la funció  $\beta_3$ -adrenèrgica i una disminució de la funció adrenèrgica del receptor  $\alpha_2$ , i determina una disminució de l'aclariment i de la sensibilitat hepàtica a la insulina (Lönnqvist F. i col., 1995). S'ha comprovat que les catecolamines indueixen una major mobilització d'àcids grassos lliures de les cèl·lules adiposes omentals en presència d'obesitat abdominal, actuant a través dels receptors  $\beta_3$ -adrenèrgics, que tenen augmentada la seva sensibilitat (Lönnqvist F. i col., 1995). El teixit adipós intraabdominal té, doncs, una elevada activitat lipolítica (Smith V. i col., 1979) i és menys sensible a l'acció antilipolítica de la insulina (Bolinder J. i col., 1983), per la qual cosa es produeix un alliberament excessiu d'àcids grassos lliures a la circulació portal i general, que causaria un augment de la producció hepàtica de partícules VLDL i un deteriorament del metabolisme i de l'acció de la insulina a nivell hepàtic, amb el conseqüent desenvolupament d'insulino-resistència (Björntorp P i Rosmond R, 2000). Aquests àcids grassos lliures interfereixen en el metabolisme de la glucosa a molts nivells, i, conseqüentment, provoquen, a la cèl·lula  $\beta$ , un estímul de secreció d'insulina, i insulino-resistència a nivell muscular. Quan la concentració d'àcids grassos lliures s'incrementa en algun individu, s'intensifica l'efecte d'insulino-resistència al múscul, i la cèl·lula  $\beta$  és incapaç d'augmentar la seva capacitat secretora, i, conseqüentment, s'inicia el desenvolupament de la diabetis mellitus no insulíndependent (Unger RH, 2001).

La SRI pot donar-se en persones primes i el fet d'estar obès o tenir una distribució central del greix corporal no significa que s'hagi de patir la SRI (Zavaroni I. i col., 1989).

### **1.2.1.2. Hipertensió**

S'entén per hipertensió a la tensió arterial superior o igual a 130/85 mmHg (segons l'NCEP: Associació Americana del Programa Nacional d'Educació del Colesterol), o superior o igual a 140/90 mmHg segons l'Organització Mundial de la Salut (OMS o WHO) o el Grup Europeu per l'Estudi de la Resistència a la Insulina (EGIR) (Dades del 2008). Els individus hipertensos de pes normal tenen menys sensibilitat a la insulina que els individus normotensos. En individus diabètics primis la hipertensió està associada a resistència a la insulina comparat amb pacients primis amb la pressió normal (Manicardi V. i col., 1986).

L'efecte net de la insulina sobre la pressió sanguínia representa un balanç entre l'efecte directe vasodilatador i l'efecte vasoconstrictor indirecte a través de l'estimulació adrenèrgica (Anderson EA. i col., 1991). L'augment de les concentracions intracel·lulars d'ions sodi i calci de la musculatura llisa vascular provoquen secreció de substàncies com norepinefrina i angiotensina (DeFronzo RA. i col., 1991 i 1992). Aquests fluxos d'ions són controlats per "bombes" insulino-sensibles (bomba calciATPasa, bomba sodipotassi ATPasa). En la resistència a la insulina l'acció d'atenuar els augments de concentració intracel·lular de calci via angiotensina II no es porten a terme amb la mateixa eficàcia que en individus normals (DeFronzo RA. i col., 1991 i 1992).

La hipertensió arterial és el factor principal de risc de malaltia cardiovascular.

### **1.2.1.3. Dislipidèmia: hipertrigliceridèmia, altes concentracions de colesterol LDL i baixes concentracions de colesterol HDL**

La dislipidèmia és el terme utilitzat per referir-se als trastorns en els quals hi ha un augment de la concentració d'una, vàries o totes les fraccions lipídiques del plasma. Els principals lípids plasmàtics són el colesterol (hipercolesterolèmia) i els triglicèrids (hipertrigliceridèmia), i també altres que circulen en sang a través de les lipoproteïnes. Aquestes lipoproteïnes es classifiquen en sis grups: quilomicrons, VLDL, IDL, quilomicrons remanents, LDL i HDL.

La insulina normalment suprimeix la producció de partícules VLDL al fetge (Durrington PN. i col., 1982; Sparks JD. i col., 1982; i Malmström R. i col., 1997). Aquest efecte no és degut únicament a la disminució de la disponibilitat de FFA després de l'efecte inhibitori de la insulina sobre la lipòlisi en el teixit adipós, sinó també a l'efecte directe de la insulina a nivell hepàtic sobre la inhibició de la producció de partícules VLDL (Malmström R. i col., 1997). En la DM 2 la insulina falla en la supressió de la producció d'apoB VLDL (Malmström R. i col., 1998); aquest defecte intrahepàtic és el mecanisme més important que intervé en l'augment de la concentració de triglicèrids en sèrum en pacients diabètics tipus 2 resistent a la insulina (Syvanne M. i col., 1997).

Hi ha una correlació inversa entre les concentracions en sèrum de triglicèrids i del colesterol HDL (Stern MP, 1997). Les partícules de HDL es formen al fetge i es transformen en HDL<sub>3</sub> i passen a plasma, i després es transformen en HDL<sub>2</sub> (Howard BV. i col., 1993). L'HDL adquireix vàries apolipoproteïnes i components lipídics com a transportadors (sobretot components de superfície) (Bagdade JD, 1993).

La lipoproteïna lipasa (LPL) (enzim que hidrolitza els quilomicrons i els triglicèrids VLDL de la circulació i proveeix els adipòcits de FFA) i la lipasa endotelial hepàtica (HL) hidrolitzen la VLDL, i, les apolipoproteïnes que se n'obtenen són captades per la HDL. Una activitat anormal de la LPL o de la HL provoca una disminució de les concentracions del colesterol HDL a causa de la disminució de la conversió de les partícules HDL<sub>3</sub> a HDL<sub>2</sub> (Eisenberg S. i col., 1999). És a dir, el catabolisme de la VLDL que porta a terme la LPL no es realitza amb la mateixa eficiència en obesos i diabètics. Això explica les baixes concentracions de colesterol HDL i l'acumulació de triglicèrids que s'observen en pacients amb DM 2. Un dels components de la VLDL que és transferit a la HDL és el colesterol lliure que és esterificat sota la influència de la lecitincolesterol aciltransferasa (LCAT) (Stern MP, 1997). Així, un defecte en la LCAT també tindria influència en la disminució de la concentració del colesterol HDL.

La LDL es pot dividir en dos tipus: tipus A i tipus B, els quals electroforèticament es classifiquen en partícules grans i en partícules petites i denses respectivament. Hi ha una gran correlació entre les partícules petites i denses i els triglicèrids en sèrum i les concentracions d'insulina. Així les partícules de LDL petites i denses estarien associades a la SRI. Els subjectes amb LDL tipus B són més resistents a la insulina que els individus amb el patró de tipus A de la LDL. L'augment d'aterosclerosi associat a l'elevada concentració de triglicèrids està relacionat amb les LDL petites i denses (Stern MP, 1997).

#### **1.2.1.4. El ferro**

El defecte més precoç i comú en individus que han estat sotmesos a una sobrecàrrega transfusional de ferro és la resistència a la insulina d'origen hepàtic (Dandona P. i col.,

1983). El dipòsit de ferro al fetge pot produir insulino-resistència per la seva capacitat d'interferir en la supressió de la producció hepàtica de glucosa induïda per la insulina (Merckel PA. i col., 1988). El dipòsit de ferro al fetge pot determinar una captació hepàtica d'insulina disminuïda, i, conseqüentment, ocasionar hiperinsulinèmia (Niederrau C. i col., 1984). A més a més, el dipòsit de ferro al fetge i al múscul podria interferir en l'acció de la insulina a aquests nivells (Shafer AI. i col., 1981 i Dandona P. i col., 1983). En estudis previs s'ha descrit una correlació directa entre la resistència a la insulina i la sobrecàrrega fèrrica quantificada mitjançant la xifra de ferritina sèrica (Merkel PA. i col., 1988 i Dmochowski K. i col., 1993) o el nombre de transfusions (Cavallo-Perin P. i col., 1995) en pacients amb  $\beta$ -talassèmia major tractats amb politransfusions. S'ha descrit una síndrome de sobrecàrrega hepàtica de ferro (comprovada per biòpsia), en presència d'una saturació a la transferrina normal i HLA-A3 negatiu, la qual cosa exclou la clàssica hemocromatosis. La majoria d'aquests pacients (amb xifres de ferritina mitjana al voltant dels 400  $\mu\text{g/l}$ ) presentaven almenys una de les següents condicions: obesitat, dislipèmia, tolerància anormal a la glucosa o hipertensió (Moirand R. i col., 1997). Aquest fet corrobora que la possible repercussió dels dipòsits de ferro sobre el metabolisme hidrocarbonat s'estableix a partir d'uns valors de ferritina sèrica considerats relativament innocus.

La flebotomia o donació de sang condueix a la disminució dels dipòsits corporals de ferro i a una millora de l'acció perifèrica de la insulina en pacients diabètics tipus 2 amb ferritina alta que no presenten mutacions característiques d'hemocromatosis genètica (Fernández-Real JM. i col., 2002).

#### **1.2.1.5. Hiperuricèmia**

Les concentracions d'àcid úric sèriques estan positivament correlacionades amb les concentracions de glucosa (Cook DG. i col., 1986) i d'insulina (Modan M. i col., 1987) i inversament correlacionades amb la sensibilitat a la insulina en els individus no diabètics (Facchini FS. i col., 1992 i Vuorinen-Markkola H. i col., 1994). En individus normals la insulina redueix l'expulsió renal de sodi i àcid úric (Quinones-Galvan A. i col., 1995). Quan un individu tolerant a la glucosa passa a ser diabètic, la glucosúria inhibeix la reabsorció d'àcid úric que serà excretat per l'orina junt amb glucosa, i les concentracions sèriques d'àcid úric disminuiran a causa de l'empitjorament de la hiperglucèmia. Això indica que l'àcid úric és un marcador de resistència a la insulina en subjectes no diabètics, però no ho és en els subjectes diabètics amb hiperglucèmia (Yki-Järvinen H, 2004).

#### **1.2.1.6. Acumulació de greix al fetge**

Aquesta acumulació de greix al fetge s'associa a un increment de la producció de glucosa, una disminució de l'oxidació dels àcids grassos i un augment de l'estrès oxidatiu i de la inflamació que deriven a una esteatohepatitis no alcohòlica (Saito T. i col., 2007).

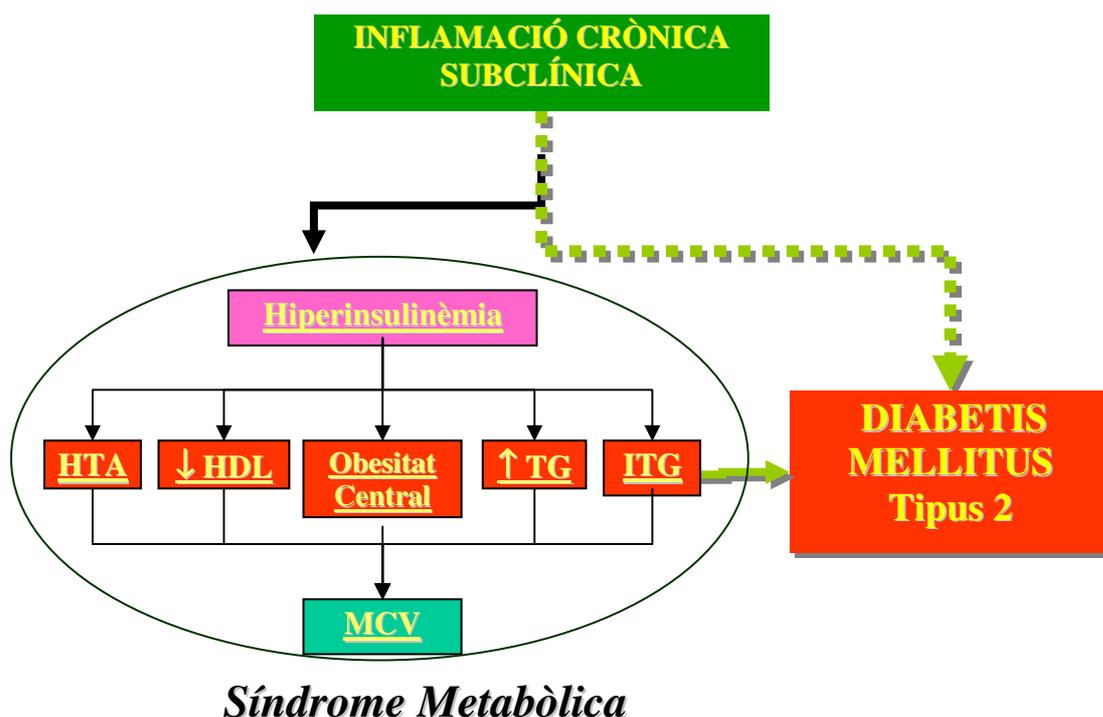
#### **1.2.2. INFLAMACIÓ, SRI I DIABETIS**

La inflamació és la resposta fisiològica davant qualsevol agressió, és a dir, l'activació del sistema immunitari. En els últims anys la resistència a la insulina és reconeguda cada vegada més com un estat inflamatori crònic (de grau baix) (Figura 1.3.)

(Fernández-Real JM. i col., 1999). Més recentment s'ha afirmat que la inflamació crònica subclínica és part de la SRI.

La desregulació de les vies inflamatòries prediuen el desenvolupament de resistència a la insulina i diabetis tipus 2 (Fernández-Real, JM. i col., 2003).

Els pacients amb aquesta activació crònica del sistema immunitari presenten un augment de reactants de fase aguda a la circulació com la proteïna C reactiva, el fibrinogen, la glucoproteïna alfa1 i la substància A amiloide del sèrum (Pickup JC. i col., 1998). També s'observa un augment de substàncies proinflamatòries circulants i un descens de substàncies antiinflamatòries (Fernández-Real JM. i col., 1999).

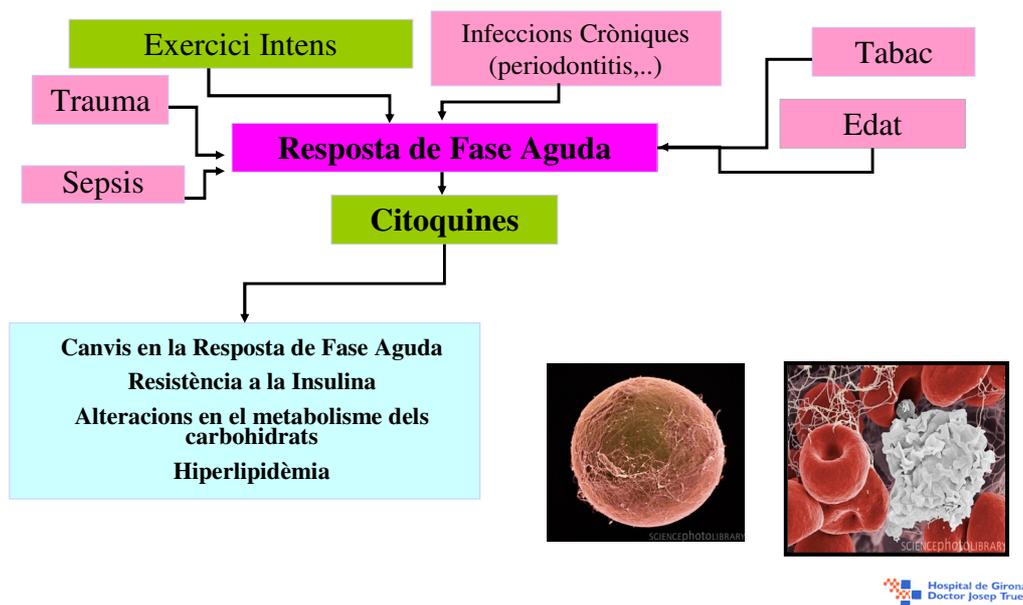


**Figura 1.3:** La Inflamació com a desencadenant de la síndrome metabòlica i conseqüentment DM 2.

HTA: hipertensió arterial, MCV: malalties cardiovasculars, HDL: lipoproteïnes d'alta densitat, ITG: intolerància a la glucosa, TG: triglicèrids. *Festa A. i col., 2000.*

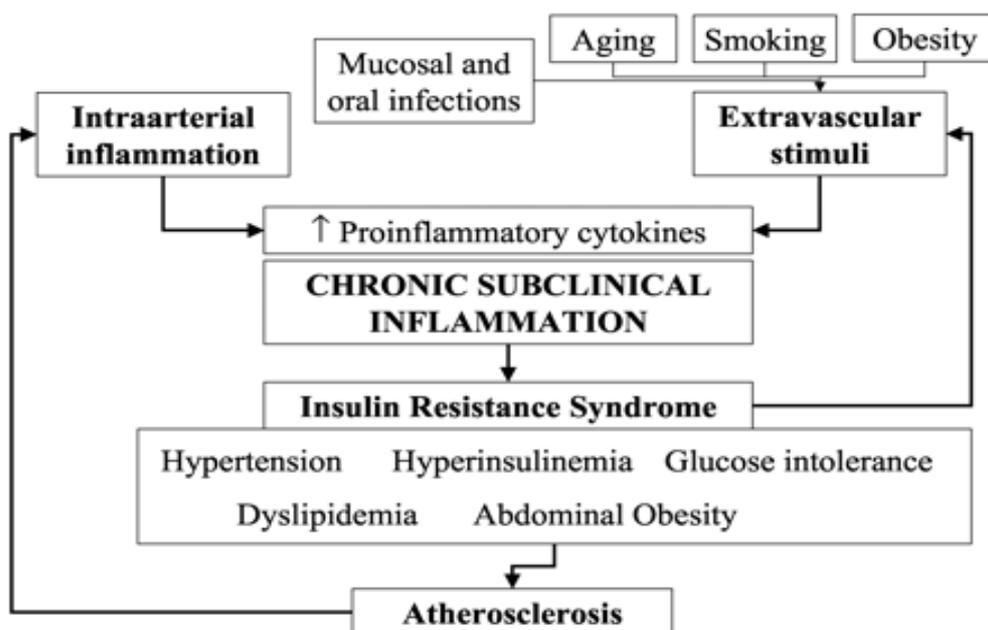
Entre les substàncies proinflamatòries destaquen diverses citocines com: la interleuquina 6 (IL-6), el factor de necrosi tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) i la IL-1, per exemple.

A més, malalties cròniques inflamatòries com l'hepatitis C, malalties pulmonars o l'artritis reumatoide augmenten significativament el risc de desenvolupar resistència a la insulina i conseqüentment DM 2. Aquest fet recolza més el lligam entre l'alteració de l'acció de la insulina i la inflamació crònica (Knobler H. i col., 2003; Lazarus R. i col., 1998; i Sattar N. i col., 2003).



**Figura 1.4:** Factors desencadenants de la SRI. *Fernández-Real JM. i col., 2003.*

L'edat, infeccions cròniques (periodontitis, bronquitis, gastritis, etc...), el tabaquisme, un trauma o una sèpsia, o l'exercici intens poden desencadenar la resposta de fase aguda. La síntesi de citoquines que desencadena aquesta resposta pot provocar canvis en la resposta de fase aguda, resistència a la insulina, alteracions en el metabolisme dels carbohidrats i hiperlipidèmia (Figures 1.4. i 1.5.).



**Figura 1.5.:** Possibles vies que determinen la inflamació crònica donant com a resultat aterosclerosi.

*Fernández-Real JM. i Ricart W., 2003.*

Igualment, subtils deficiències de proteïnes del sistema immunològic innat (el CD14 soluble, l'MBL i la BPI) s'han associat a alteracions del metabolisme de la glucosa. Aquestes deficiències corren en paral·lel amb la inflamació i al deteriorament de l'acció de la insulina (Megia A. i col., 2004; i Gubern C. i col., 2006).

### **1.2.2.1. Inflamació i Obesitat**

Hotamisligil GS. i col·laboradors (1993) van demostrar que el teixit adipós expressava constitutivament la citoquina proinflamatòria TNF $\alpha$  i que la seva expressió era més elevada en el teixit adipós d'animals obesos. Aquestes observacions foren el nexe d'unió entre la resistència a la insulina, les citoquines proinflamatòries (adipoquines) i l'obesitat, i així es va introduir el concepte d'inflamació com a modulador fisiopatològic de les alteracions metabòliques associades a obesitat (Hotamisligil GS. i col., 1993).

Durant l'última dècada s'ha defensat que l'obesitat està lligada a un estat crònic d'inflamació. Les concentracions elevades de lípids també és una característica de l'obesitat, de les infeccions i altres estats inflamatoris; i la dislipidèmia contribueix en el desenvolupament d'arteriosclerosi (Welles KE. i col., 2005).

L'augment de la massa del teixit adipós en l'obesitat va acompanyat de canvis a nivell circulatori de la concentració de moltes hormones i metabòlits. Això és degut a que el teixit adipós (sobretot el visceral) té funcions similars a diverses cèl·lules immunitàries com les d'activació del complement i la producció de citoquines (que en aquest cas s'anomenen adipoquines: com el TNF- $\alpha$ , la IL-6, la leptina, la visfatina, la resistina, etc...) les quals s'associen a molts dels canvis metabòlics de la SRI (Wajchenberg BL., 2000; i Recasens M. i col., 2004) (veure apartat 1.3.3.). Unes concentracions elevades de diferents citoquines proinflamatòries, com la IL-6, la IL-18 i el TNF- $\alpha$ , com també de la PCR s'han associat a indicadors de l'augment del greix corporal: com el pes, l'IMC, i factors de risc cardiovascular (Mohamed-Ali V. i col., 1997; i Hotamisligil GS. i col., 1993).

A més, moltes hormones, citoquines, proteïnes de senyal, factors de transcripció i lípids bioactius poden funcionar en les vies metabòliques i immunològiques alhora (Welles KE. i col., 2005). Els adipòcits poden expressar moltes proteïnes macrofàgiques com el TNF- $\alpha$ , la IL-6 i les MMPs (Hotamisligil GS. i col., 1993; Makowski L. i col., 2001; i Bouloumine A. i col., 2001). Els macròfags poden captar i emmagatzemar lípids per convertir-se en cèl·lules ateroscleròtiques; i els preadipòcits, en condicions especials, poden tenir propietats fagocítiques i antimicrobianes (Cousin B. i col., 1999; i Charriere G. i col., 2003). En l'obesitat trobem macròfags en el teixit adipós. Aquests macròfags sembla ser que contribueixen a la producció de mediadors inflamatoris (citoquines inflammatòries i quimioquines), sols o conjuntament amb els adipòcits (Weisberg SP. i

col., 2003; i Xu H. i col., 2003). Així, doncs, els macròfags també tenen una important influència en promoure resistència a la insulina (Welles KE. i col., 2005).

Els gens de resposta inflamatòria i estrès estan regulats en el teixit adipós d'animals obesos (Soukas A. i col., 2000; i Xu H. i col., 2003). La supressió de mediadors inflamatoris (com el TNF- $\alpha$ , el JNK i la IKK) protegeix de la resistència a la insulina en models de ratolins obesos; i el tractament amb fàrmacs (antiinflamatoris, com el salicilat sòdic) que afecten les vies d'acció d'aquests mediadors milloren la sensibilitat a la insulina en humans i la secreció d'insulina (Hotamisligil GS. i col., 1995; Uysal KT. i col., 1997; Hirosumi J. i col., 2002; Yuan C. i col., 2002; i Yuan M. i col., 2001; Fernández-Real JM. i col., 2008).

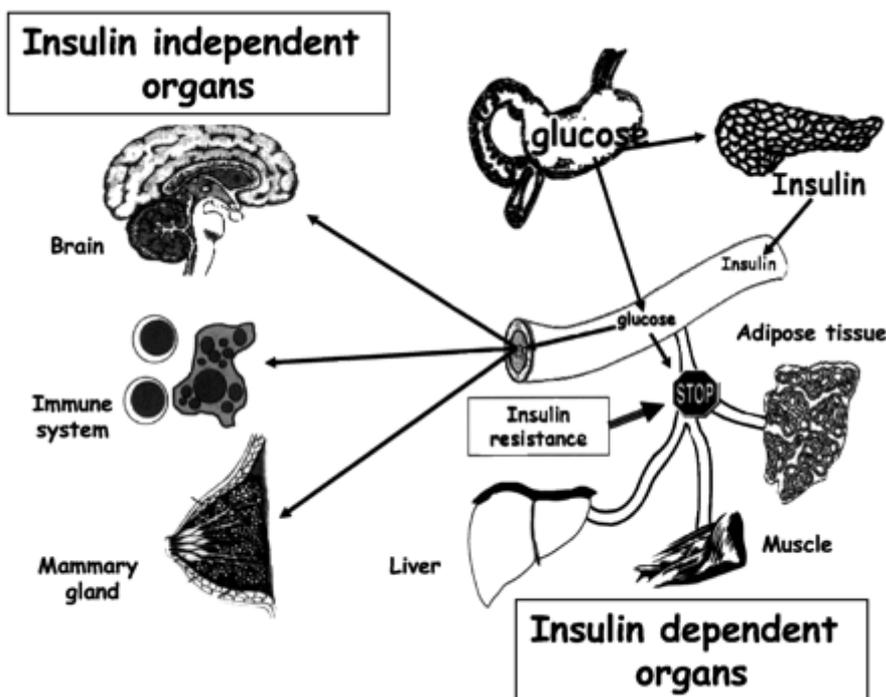


### **1.3. MECANISMES MOLECULARS**

Està clar que la inhibició de la via de senyalització del receptor de la insulina és el principal mecanisme pel qual la inflamació i l'estrès donen resistència a la insulina. Per això seguidament es descriuen els actors implicats en aquest procés i altres relacionats amb la síndrome metabòlica.

#### **1.3.1. LA INSULINA**

La insulina és una hormona del sistema endocrí que és segregada per les cèl·lules  $\beta$  dels illots de Langerhans del pàncrees. Les cèl·lules  $\beta$  pancreàtiques secreten insulina en resposta a l'augment de la concentració de glucosa en plasma després de la ingesta; i la combinació d'hiperinsulinèmia i hiperglucèmia promou l'entrada de glucosa als teixits i òrgans, com el fetge, el territori esplàncnic i el teixit muscular, i suprimeix la producció de glucosa a nivell hepàtic i la cetogènesi (DeFronzo RA. i col., 1997) (Figura 1.6.).



**Figura 1.6.:** Òrgans insulino independents i insulino dependents. S'observen els òrgans insulino dependents per obtenir glucosa: fetge, múscul i teixit adipós i els insulino independents: cervell, sistema immunitari i glàndula mamària. *Fernández-Real JM. i Ricart W., 2003.*

La insulina promou la conversió de la glucosa a glicogen i triglicèrids, i a nivell hepàtic inhibeix la hidròlisi dels triglicèrids i del glicogen. També afavoreix la captació d'aminoàcids per sintetitzar proteïnes i inhibeix el catabolisme proteic en quasi tots els teixits (Figura 1.7.) (Heesom KJ. i col., 1997).

## QUÈ FA LA INSULINA?

### ESTIMULA:

- ENTRADA DE GLUCOSA EN TEIXITS (NO EN EL CERVELL)
- TRANSPORT D'AMINOÀCIDS
- SÍNTESI DE LÍPIDS
- SÍNTESI DE PROTEÏNES
- CASCADES DEPENDENTS DE FOSFORILACIÓ
- SÍNTESI DE GLICOGEN
- SÍNTESI D'ADN
- TRANSPORT D'IONS
- TRANSCRIPCIÓ DE GENS

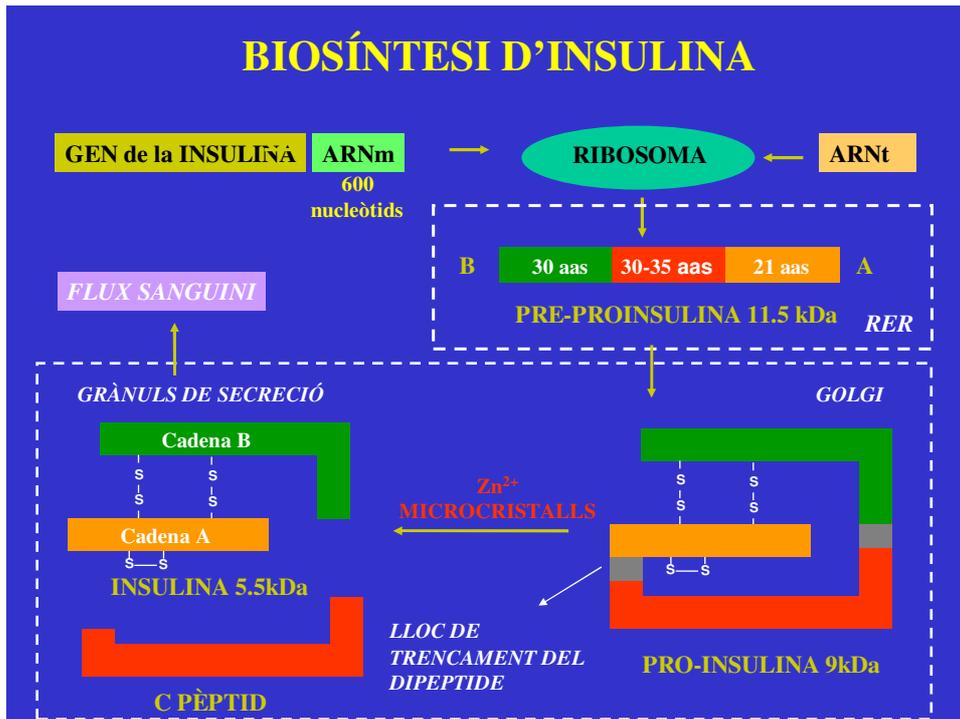
### INHIBEIX:

- HIDRÒLISI DEL GLICOGEN
- LIPÒLISI
- DEGRADACIÓ DE PROTEÏNES
- MORT DE CÈL·LULES APOPTÒTIQUES

***Figura 1.7.*** Accions de la insulina. Wynn J., *Cell Physiology*.

La insulina es sintetitza en forma d'un precursor: la preproinsulina, que serà transformada a l'aparell de Golgi per donar lloc a la proinsulina, que té 9.000 Da. La proinsulina pateix un procés de maduració per mediació d'una proteasa que trenca la molècula i dóna lloc a dos pèptids: la insulina i el pèptid C, de 6.000 i 3.000 Da respectivament (Gomis R. i col., 1996). El pèptid C s'utilitza en molts estudis com a mesura indirecta de la concentració d'insulina. La insulina està formada per dues cadenes polipeptídiques, A i B, connectades entre si per enllaços disulfur (Figura 1.8.) (Soler J. i col., 1996). Quan es separen les dues cadenes desapareix l'activitat funcional de la molècula. La insulina és secretada a la sang i s'uneix al seu receptor a les cèl·lules diana (Gomis R. i col., 1996). En excés és degradada per l'enzim insulinas a al fetge i al ronyó. Amb la unió de l'hormona al receptor, les membranes de les cèl·lules musculars, dels adipòcits i altres tipus cel·lulars es fan molt permeables a la glucosa que entrarà a

les cèl·lules mitjançant els seus transportadors. La membrana cel·lular es fa molt permeable, també, a molts aminoàcids, als ions potassi, als ions magnesi i als ions fosfat.



**Figura 1.8.** Ruta de la síntesi d'insulina. Wynn J., *Cell Physiology*.

La glucosa és transportada per uns transportadors dels quals destaquen el GLUT 4: és regulat per la insulina, localitzat en els teixits sensibles a la insulina (múscul i adipòcits) i està associat a l'hexocinasa II. El GLUT 1 és el transportador predominant en els teixits independents de la insulina (cervell, eritròcits, etc...) que també es troba a múscul i adipòcits (seria un transportador basal de glucosa). El GLUT 1 es localitza a la membrana plasmàtica on la seva concentració varia poc després de la secreció d'insulina i està associat a l'hexocinasa I. El GLUT 2 es localitza predominantment al

fetge i a les cèl·lules  $\beta$  pancreàtiques on es troba associat a l'hexocinasa IV. Alguns investigadors han observat que els transportadors de glucosa disminueixen en els adipòcits i en el teixit muscular en la DM 2 (DeFronzo RA. i col., 1997).

En absència d'insulina (DM 1) o en la resistència a la insulina (DM 2), augmenta la glucèmia ja que es desregulen i/o disminueixen els transportadors de glucosa. S'inverteixen tots els efectes hormonals que causen l'emmagatzematge de greix i provoca la lipòlisi; s'activa la lipasa hormono-sensible de les cèl·lules adiposes, produint una hidròlisi dels triglicèrids emmagatzemats i alliberant grans quantitats d'àcids grassos al plasma, que es transformen en el principal substrat d'energia utilitzat per quasi tots els teixits de l'organisme.

Sense l'acció de la insulina, pràcticament tot l'emmagatzematge proteic s'interromp. Augmenta el catabolisme proteic, s'atura la síntesi de proteïnes i passen grans quantitats d'aminoàcids al plasma. Aquests aminoàcids s'utilitzen com a substrat d'energia o per la gluconeogènesi. La degradació d'aminoàcids produeix també un augment de l'eliminació d'urea per l'orina. Això pot produir una gran debilitat corporal i una alteració generalitzada a molts òrgans (Heesom KJ. i col., 1997).

Així, els factors responsables del manteniment de la tolerància a la glucosa en individus sans són:

- la secreció d'insulina.
- l'entrada de glucosa als teixits (principalment múscul, teixit adipós, fetge i territori esplàncnic)
- la supressió de la producció hepàtica de glucosa.

La insulina és secretada de forma pulsàtil en humans. En pacients amb DM 2 o amb intolerància a la glucosa es perd la pulsativitat de la secreció d'insulina (DeFronzo RA. i col., 1997) i aquest fet contribueix a danyar la supressió hepàtica de la glucosa (Bratusch-Marrain PR. i col., 1986).

### **1.3.2. EL RECEPTOR DE LA INSULINA**

El receptor de la insulina pertany a una família de receptors tirosín quinases (amb activitat tirosina quinasa) que inclou el receptor del factor de creixement de tipus insulínic (IGF-1: de l'anglès *insulin-like growth factor receptor*) i el receptor relacionat amb la insulina (IRR: de l'anglès *insulin-related receptor*) (Patti ME i Kahn CR, 1998).

El receptor de la insulina és sintetitzat inicialment com un únic polipèptid, el preproreceptor, que conté tant la subunitat  $\alpha$  com la subunitat  $\beta$ . Aquest polipèptid haurà de patir una sèrie de modificacions per tal de generar el receptor madur.

El receptor madur és localitzat a la membrana plasmàtica en forma d'heterotetràmer ( $\alpha_2\beta_2$ ), on la subunitat  $\alpha$  amb un pes de 135 kDa té la capacitat d'unir-se a la insulina, i la subunitat  $\beta$  de 95 kDa té activitat tirosina quinasa intrínseca. Les seves subunitats  $\beta$  presenten aquesta activitat i catalitzen tant l'autofosforilació de la pròpia subunitat  $\beta$  com la fosforilació dependent d'insulina de substrats proteics. Les fosforilacions es donen en residus de tirosines, situades a la subunitat  $\beta$  i provoquen l'increment de l'eficiència catalítica de la quinasa (Hedin CH. i col., 1996). El nombre de receptors presents a la membrana pot variar en funció de la concentració del seu lligand (Knutson VP, 1991).

Un cop la subunitat  $\alpha$  del receptor s'ha unit a la insulina aquest complex s'internalitza cap a la cèl·lula via endocitosi mediada per receptor. Un cop el receptor s'ha alliberat de la insulina es pot reciclar o degradar.

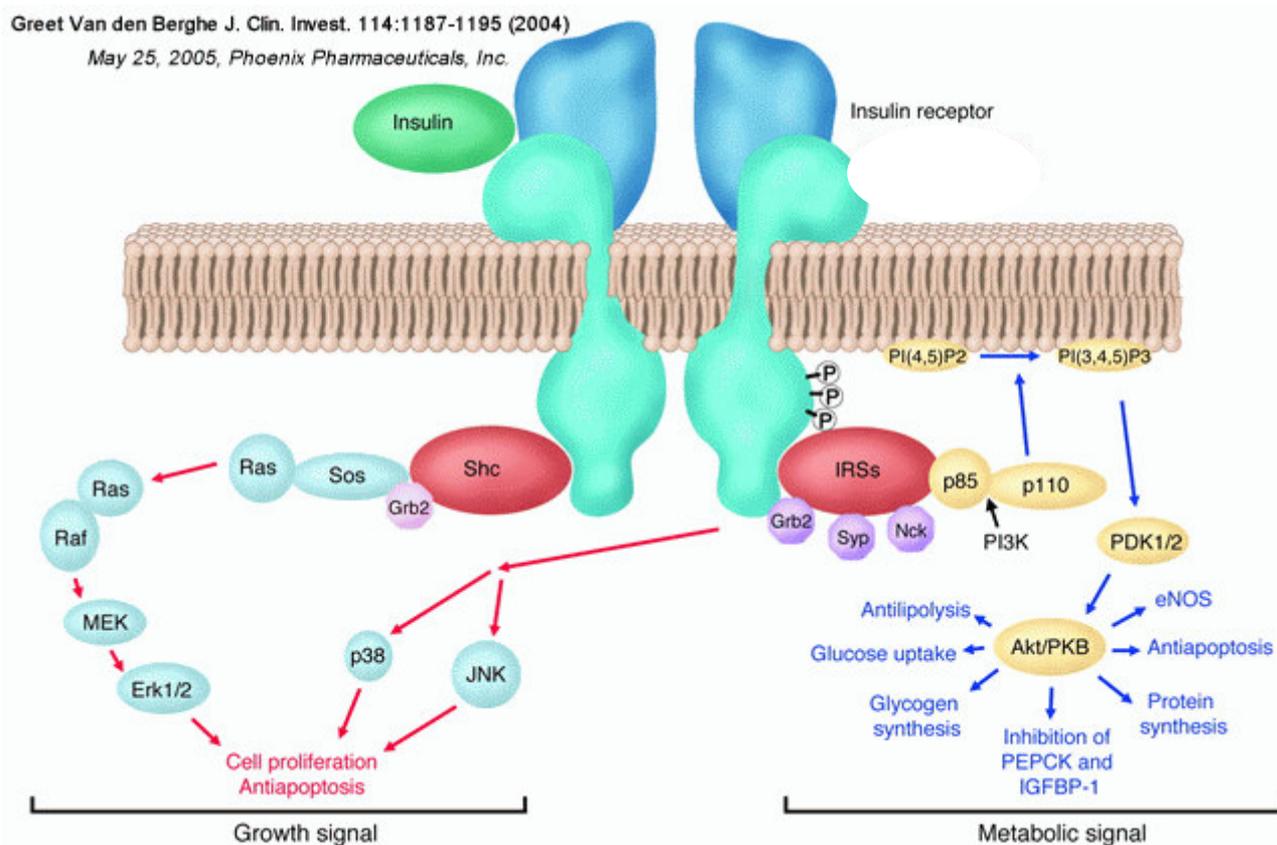
La via de senyalització de la insulina passa per una xarxa complexa de substrats intracel·lulars que actuen com a segons missatgers (Figura 1.9.). El primer substrat clonat del receptor de la insulina és l'IRS-1 i té un domini en el seu extrem NH<sub>2</sub>-terminal que pot unir fosfolípids i es troba en moltes proteïnes relacionades amb la senyalització intracel·lular que necessiten associar-se a la membrana cel·lular per actuar, com són Sos, PKB,  $\beta$ -ark, etc... (Combettes-Souverain M. i col., 1998). L'IRS-1 també té un domini d'unió a fosfotirosines (PTB); es tracta d'un domini important en la interacció entre molècules senyalitzadores amb motius tirosina fosforilats. També té unes 30 Ser/Thr en seqüència consens de fosforilació per serín/treonín quinases. L'IRS-1 és fosforilat pel mateix RI (White MF. i col., 1997; i Saltiel AR. i col., 2002). L'IRS-1 té un nivell basal de fosforilació en serines molt alt, i és ràpidament fosforilat en treonines i serines en resposta a la insulina (Sun XJ. i col., 1991 i 1992). Quan l'IRS-1 és fosforilat en Tyr, aquest s'associa a diferents proteïnes que contenen dominis SH2 (Src homòleg 2) com són la subunitat p85 de la PI3-K (fosfatidilinositol 3-quinasa), la proteïna 2 d'unió a receptors de factors de creixement (Grb2) i la tirosina fosfatasa SHP2. L'associació d'aquestes proteïnes amb l'IRS-1 permet la seva pròpia activació i la transmissió de senyal entrant en una cascada d'activació d'enzims que finalitza amb les accions anabòliques de la insulina (Riqué S., 2001).

La inhibició d'aquestes senyals degut a factors inflamatoris causa resistència a la insulina. La fosforilació de les tirosines de l'IRS-1 estimulada per la insulina està disminuïda en l'obesitat, i aquesta disminució es creu que és la base del desenvolupament de la resistència a la insulina (Saltiel AR i Kahn CR, 2001).

***Vies de senyalització***

Les dues vies de senyalització més importants o conegudes que activa la insulina són la p42/p44Map quinasa i la PI3 quinasa/PKB (Figura 1.9.).

Altres proteïnes que interaccionen directament amb el receptor són: la *Src homology collagen protein* (Shc), la *Grb2-associated binder-1* (Gab 1), i les proteïnes reguladores de senyal (SIRPs) (Combettes-Souverain M. i col., 1998).



**Figura: 1.9.:** Model simplificat de reaccions que desencadena la unió al RI. La insulina s'uneix al domini extracel·lular del receptor de la insulina i li provoca un canvi conformacional que permet una autofosforilació del receptor (P) i la fosforilació de les tirosines dels substrats de les proteïnes intracel·lulars. Hi ha dues vies principals activades per la insulina: (a) una és la cascada de senyal de la MAPK, en la qual la via Grb2/Sos activa la senyal de Ras, afectant la proliferació cel·lular i l'apoptosi. (b) L'altra és la via d'IRS, la qual activa les quinases dependents de l'heterodimèric (p85/p110) PI3K, com l'Akt, també anomenada proteïna quinasa B (PKB); l'Akt modula l'activitat enzimàtica que, a part d'afectar la generació de NO (òxid nítric) i l'apoptosi, controla el metabolisme de la glucosa, dels lípids i de les proteïnes. PI(4,5)P2, *phosphoinositide 4,5 di-phosphate*; PI(3,4,5)P3, *phosphoinositide 3,4,5 triphosphate*; PDK1, *phosphoinositide-dependent kinase-1*; MEK, *kinasa MAPK*. Greet Van den Berghe, 2004.

### **1.3.3. LES CITOQUINES I ALTRES MOLÈCULES IMPLICADES**

Les citoquines (o citocines) són un grup de proteïnes o glicoproteïnes secretades de baix pes molecular (de menys de 30 kDa), produïdes durant les respostes immunitàries natural i específica. Moltes d'elles pertanyen a la família de les hematopoetines, i tenen estructures terciàries similars: una configuració a base d'un conjunt de quatre hèlix- $\alpha$  i una estructura en làmina  $\beta$ .

Generalment actuen com a missatgers intercel·lulars que solen intervenir en la maduració i amplificació de la resposta immunològica, provocant múltiples activitats biològiques.

S'uneixen a receptors específics de la membrana de les cèl·lules on exerceixen la seva funció, iniciant una cascada de transducció de senyal intracel·lular que altera el patró d'expressió gènica, de manera que aquestes cèl·lules diana produeixen una determinada resposta biològica (Male D. i col., 1996).

Les citoquines són produïdes per molts tipus cel·lulars diferents, principalment del sistema immunitari, i també pel teixit adipós (principalment el visceral) i el teixit endotelial (Kushner I., 1993). Dins del sistema immunitari innat, els macròfags són les cèl·lules més productores de citoquines, mentre que en el sistema immunitari adquirit ho són les cèl·lules T col·laboradores. També els monòcits produeixen citocines (Kushner I., 1993).

A trets generals les respostes principals que desencadena l'acció de les citoquines són:

- L'activació dels mecanismes d'immunitat natural com l'activació dels macròfags i altres fagòcits, l'activació de les cèl·lules *natural killer*, l'activació dels eosinòfils i la inducció de les proteïnes de fase aguda al fetge.

- L'activació i proliferació de les cèl·lules B, fins a la seva diferenciació a cèl·lules plasmàtiques secretores d'anticossos.
- La intervenció en la resposta cel·lular específica.
- El control dels processos hematopoètics de la medul·la òssia.
- I la inducció de la curació de les ferides.

Les citoquines són inespecífiques respecte a l'antigen, però, en canvi, tenen una acció de tipus específica. Això és degut a que els receptors cel·lulars, indispensables per tal que la citoquina exerceixi la seva funció, només s'expressen en tipus cel·lulars concrets. També es deu a que hi ha uns requeriments de contactes cèl·lula a cèl·lula; les citoquines només arriben a unes concentracions determinades adequades per actuar en l'estret espai que queda entre dues cèl·lules interactuant. La vida mitja de les citoquines en sang i fluids és molt curta, fet que assegura que actuaran en un marge de temps estret, prop de la zona on s'han produït (Male D. i col., 1996).

El TNF- $\alpha$  és una citoquina la producció de la qual és elevada en el teixit adipós i múscul d'individus obesos (Hotamisligil GS. i col., 1995; i Saghizadeh M. i col., 1996). L'exposició de les cèl·lules al TNF- $\alpha$  o bé a les elevades concentracions d'àcids grassos estimula la fosforilació inhibidora dels residus de serina de l'IRS-1 (Yin MJ. i col., 1998; i Aguirre V. i col., 2000). Aquesta fosforilació redueix la fosforilació de la tirosina de l'IRS-1 en resposta a la insulina i l'habilitat d'IRS-1 d'associar-se al receptor de la insulina, i, així, inhibeix la senyal intracel·lular i l'acció de la insulina (Hotamisligil GS. i col., 1996; Aguirre V. i col., 2000; i Paz K. i col., 1997).

El TNF- $\alpha$  també estimula la producció d'IL-6 (Yki-Järvinen H, 2004). Com que el TNF- $\alpha$  no és secretat al sistema circulatori, actuaria com a regulador local de la

producció d'IL-6 (Mohamed-Ali V. i col., 1997). El TNF- $\alpha$  fou la primera citoquina inflamatòria que es va veure sobreexpressada en teixit adipós de models de ratolins obesos (Hotamisligil GS. i col., 1993; i Sethi JK. i col., 1999). Si es tracten cultius cel·lulars o animals de laboratori amb TNF- $\alpha$  es deteriora l'acció de la insulina; i en models de ratolins obesos sense TNF- $\alpha$  funcional o amb els seus receptors no funcionals presenten millores en la sensibilitat a la insulina comparat amb els salvatges (Hotamisligil GS. i col., 1993; i Uysal KT. i col., 1997).

El TNF $\alpha$  i la IL-1 $\beta$  activen les rutes inflamatòries de la JNK i IKK $\beta$ /NF $\kappa$ B a través de processos mediatos pels seus receptors. Aquestes rutes inflamatòries són activades per uns receptors (*toll like receptors* (TLR) i *receptors advanced glycation end products* (RAGE)) que reconeixen molècules foranes a la cèl·lula. Els lligands dels TLR són molècules microbianes com els LPS, les càpsules virals, etc. S'ha demostrat que alguns àcids grassos humans es poden unir a alguns TLR i activar les vies proinflamatòries (Kim JK, 2006; i Shi H. i col., 2006).

La IL-6 és una altra citoquina produïda majoritàriament al teixit adipós visceral i subcutani i es secreta al sistema circulatori. Les seves concentracions són elevades en subjectes obesos (Yudkin JS. i col., 2000; i Catalano C. i col., 1997). Concentracions elevades d'IL-6 estan relacionades amb la resistència a la insulina (Fernández-Real JM. i col., 2001) i és un predictor de desenvolupament de DM 2 (Pradhan AD. i col., 2001; i Spranger J. i col., 2003).

La leptina és una altra citoquina que atenua les accions metabòliques de la insulina en cèl·lules d'hepatoma humà (Cohen B. i col., 1996), i s'ha arribat a especular que podria ser diabetògena (Taylor SI. i col., 1996). La leptina també deteriora l'acció de la

insulina en adipòcits de rata aïllats (Muller G. i col., 1997). Malgrat això, les troballes d'investigacions *in vitro* es contradiuen amb les observacions efectuades *in vivo*. L'administració crònica del producte del gen *ob* (gen de la leptina) a ratolins *ob/ob* (obesos), va fer disminuir la concentració sèrica d'insulina, mentre que en ratolins *db/db* (diabètics), no s'observà aquest efecte (Schwartz MW. i col., 1996). Aquests efectes van ocórrer abans de revertir l'obesitat. L'administració de leptina, féu augmentar la sensibilitat a la insulina en rates normals, tant en dejú com en presència d'hiperinsulinèmia, a una concentració fixa de glucosa, fent augmentar l'ús de glucosa fins a un 30% (Sivitz WI. i col., 1991). En humans, però, la leptina no sembla tenir una acció significativa (Hukshorn CJ. i col., 2002).

La IL-18, que indueix la producció d'INF- $\gamma$  per part dels limfòcits T i que té un paper central en la via inflamatòria, és considerat un fort predictor de mort per causes cardiovasculars en pacients amb malaltia coronària. L'augment de la IL-18 prediu el desenvolupament de la DM 2 (Thorand B. i col., 2005).

L'adiponectina és una citoquina antiinflamatòria (Steppan CM. i col., 2001). L'adiponectina és sintetitzada exclusivament pel teixit adipós (adipocitoquina) i produïda durant la diferenciació dels adipòcits. Malgrat això, les seves concentracions circulants són més baixes en subjectes obesos que en no obesos, al contrari que la majoria de les adipocitoquines, els nivells de les quals estan augmentats en l'obesitat en proporció directa amb l'augment de la massa corporal. S'ha demostrat que el TNF- $\alpha$  és capaç de reduir l'expressió i secreció de l'adiponectina. És possible assumir que el TNF- $\alpha$  i, potser, altres adipocitoquines poden ser parcialment responsables de la disminució de la producció d'adiponectina en l'obesitat (Arita Y. i col., 1999; i Kappes

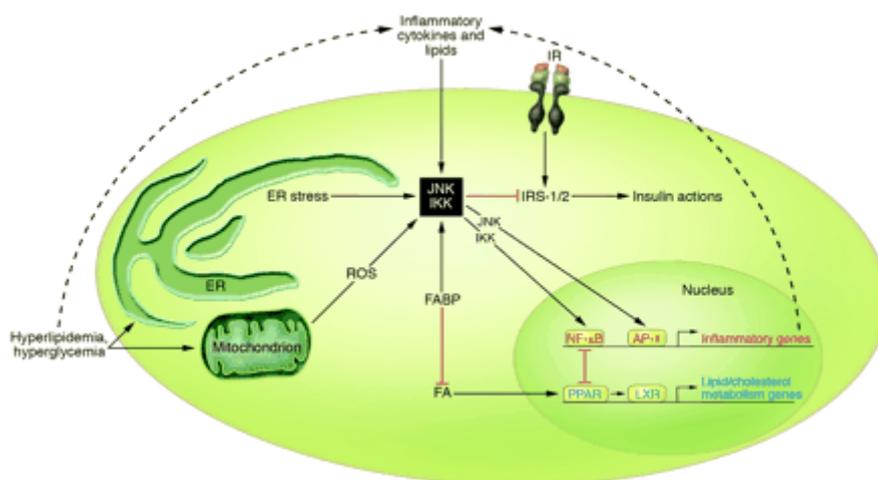
A. i col., 2000). Altres estudis sobre la regulació de l'adiponectina revelen que l'adiponectina és sobrerregulada per les tiazolidinediones (un fàrmac antidiabètic que afavoreix l'adipogènesi) i que és inhibida pels agonistes  $\beta$ -adrenoceptors, pels glucocorticoides i per la IL-6; aquestes observacions donen suport al paper de l'adiponectina com a important sensibilitzador endogen de la insulina (Fasshauer M i Paschke R, 2003).

També s'han trobat concentracions baixes d'adiponectina en pacients hipertensos, diabètics i també amb cardiopatia coronària. En un estudi s'ha trobat una associació entre les baixes concentracions d'adiponectina i la resistència a la insulina i la hiperinsulinèmia (Weyer C. i col., 2001). També s'ha demostrat una correlació negativa entre les concentracions d'adiponectina i els triglicèrids plasmàtics i positiva amb les concentracions de colesterol HDL en individus amb DM 2 (Lindsay RS. i col., 2002; Hotta K. i col., 2000; i Matsubara M. i col., 2002). Aquests resultats suggereixen que la hipoadiponectinèmia observada en la dislipidèmia pot accelerar els canvis arterioscleròtics observats en la síndrome metabòlica.

Estudis experimentals, també, han indicat que l'adiponectina té propietats antiaterogèniques. L'adhesió dels monòcits a l'endoteli vascular i la seva diferenciació posterior a macròfags i cèl·lules espumoses és crucial pel desenvolupament de la malaltia vascular. L'adiponectina té efectes sobre l'adhesió dels monòcits a l'endoteli, sobre la diferenciació mieloide i la producció de citoquines per part dels macròfags i en la fagocitosi. Inhibeix la producció i l'acció del TNF- $\alpha$ , que té efectes directes sobre l'adhesió molecular; i modula parcialment la senyal del factor nuclear kB (NFkB) que és un factor de transcripció involucrat en la resposta inflamatòria (Ouchi N. i col., 2001).

La resistina pertany a la família de les proteïnes amb dominis C-terminal rics en cisteïnes anomenades *resistin-like molecules* (Holcomb IN. i col., 2000; Kim KH. i col., 2001; i Stepan CM. i col., 2001a). Les concentracions de resistina sèrica estan marcadament augmentades en ratolins obesos i disminuïdes després del tractament amb tiazolidinediones (Stepan CM. i col., 2001b). El seu paper en humans és controvertit.

S'ha vist recentment que les vies de senyal inflamatòries poden ser activades per l'estrès metabòlic originat dins o fora la cèl·lula (Figura 1.10.). L'obesitat, l'hiperglucèmia, i l'hiperinsulinèmia sobrecarreguen la capacitat funcional del RE (reticle endoplasmàtic) (Ozcan U. et al., 2004; i Ozawa K. i col., 2005) i provoquen un augment en la producció de ROS per part de la mitocòndria (Lin Y. i col., 2005; i Furukawa S. i col., 2004); aquests dos fets convergeixen en l'activació de les vies inflamatòries i donen resistència a la insulina (Figura 1.10.). En aquestes vies inflamatòries hi destaca la participació de les quinases i factors de transcripció JNK, IKK i NFκB.



**Figura 1.10.:** Model de la via de senyalització (*signaling*) metabòlica i inflamatòria en adipòcits o macròfags. Les vies inflamatòries poden ser iniciades per mediadors extracel·lulars com les citoquines i lípids, o intracel·lular com l'estrès del RE o bé un excés de producció de ROS per part de la mitocondria. Aquests mediadors convergeixen en les vies del *signaling* inflamatori, incloent les quinases JNK i IKK. Aquestes vies permeten la producció de mediadors inflamatoris addicionals a través de la regulació transcripcional tan bé com la inhibició directa de la via de senyalització de la insulina. Els factors de transcripció de les famílies PPAR i LXR promouen el transport de nutrients i el metabolisme i l'activitat oposada a la inflamació. Els FABPs segresten lligands d'aquests factors de transcripció, així promouen la inflamació. Per tant, l'absència de FABPs és antiinflamatòria. La cèl·lula ha de trobar un equilibri entre el metabolisme i la inflamació. En condicions de sobrenutrició s'observa un metabolisme oxidatiu mitocondrial i un augment de la síntesi de proteïnes en el RE, i tot això induïx la resposta inflamatòria (Wellen KE. i Hotamisligil HG., 2005).

La JNK és una quinasa que fosforila el component Jun del factor de transcripció AP-1. La JNK estimula la resistència a la insulina mitjançant la fosforilació de residus de serina de l'IRS1.

L'NFκB prové de la degradació del complex IKKβ-NFκB i promou la transcripció de molts gens que induïxen resistència a la insulina (com el TNFα, la IL-6, la IL-1β...) que, a més, estimulen l'activació de les rutes JNK i NFκB.

### **1.3.4. ALGUNS MARCADORS INFLAMATORIS**

Algunes citoquines com la IL-1, la IL-6 i el TNF $\alpha$  estimulen la síntesi al fetge de proteïnes de fase aguda en situacions d'estrès (infecció, inflamació, dany tissular o malaltia, per exemple). Aquestes proteïnes tenen moltes activitats que contribueixen en la defensa i cura de l'hoste.

Les proteïnes de fase aguda que augmenten en situacions d'estrès són, per exemple, el fibrinogen, la glicoproteïna àcida  $\alpha$ 1, l'antiquimiotripsina  $\alpha$ 1, l'haptoglobina, la proteïna C-reactiva, i la proteïna A amiloide del sèrum (Pickup JC i Crook MA, 1998).

La concentració sèrica d'àcid siàlic és un marcador de la resposta de fase aguda de la major part de les proteïnes de fase aguda ja que soler ser glicoproteïnes amb àcid siàlic al final de la seva cadena oligosacàrida (Taniuchi K. i col., 1981).

La proteïna C-reactiva (PCR) és un marcador de la reacció de fase aguda i s'ha demostrat que està correlacionada amb múltiples característiques de la resistència a la insulina. Està correlacionada amb la glucosa, la insulina, amb el colesterol HDL en estudis de salut cardiovascular, i amb la grassa corporal general i la quantitat de teixit adipós visceral (el pes, el perímetre de la cintura) en diferents estudis realitzats (Yki-Järvinen H, 2004). La IL-6 és el principal regulador de la síntesi de proteïna C-reactiva en el fetge (Mohamed-Ali V. i col., 1997). La concentració de PCR és un predictor de malaltia cardiovascular (Haverkate F. i col., 1997; Ridker PM. i col., 1997).

La infusió experimental de PCR humana recombinada indueix l'expressió de molècules d'adhesió V-CAM, I-CAM i E-selectina en cèl·lules endotelials humanes. Un increment de les adhesions endotelials i de la permeabilitat, en la resposta primària a la inflamació,

permet l'entrada dels leucòcits dins la paret interna dels vasos. Les selectines estan involucrades en la fluctuació dels leucòcits; i les molècules d'adhesió cel·lular (ICAM-1) i les molècules d'adhesió cel·lular vasculars (VCAM-1) permeten la subseqüent adhesió dels leucòcits a la paret vascular. Aquest fet és induït per altres citoquines com l'INF- $\gamma$ . Així es completa un cicle en el qual els factors d'adhesió cel·lular condicionen la inflamació i els productes que es formen afavoreixen el mateix procés inflamatori (Zachary T. i Bloomgarden MD., 2003).

També s'ha observat un augment de la proteïna A amiloide del sèrum en la DM 2. Aquesta proteïna desplaça l'apolipoproteïna A1 de la HDL<sub>3</sub>; així augmenta la unió de la HDL als macròfags i actua com a senyal per desviar el colesterol HDL del fetge als macròfags per reparar teixits (Steel DM. i Whitehead AS., 1994; Cabana VG. i col., 1989). Aquest augment del catabolisme explicaria les baixes concentracions de HDL en la DM 2; i la unió de la HDL als macròfags en la placa ateroscleròtica podria ser la causa de l'augment del risc de problemes circulatoris arterials en la DM 2.

El fibrinogen també es troba en elevades concentracions en individus amb DM 2. És un factor de risc important en malalties coronàries (Ganda OM. i Arkin CF., 1992; Kannel WB. i col., 1990).

Altres proteïnes de fase aguda amb altes concentracions en individus amb DM 2 són el factor de von Willebrand (Steel DM. i Whitehead AS., 1994), components del complement (Figueredo A. i col., 1993), la lipoproteïna Lp(a) (associada a malaltia coronària, també) (Steel DM i Whitehead AS, 1994; Pickup JC. i col., 1995; Watts GF. i

col., 1995; Maeda S. i col., 1989) i PAI-1 (inhibidor-1 de l'activador del plasminogen) (Yudkin J, 1995).

S'ha associat a la resistència a la insulina un augment de la concentració de PAI-1, un deteriorament de la fibrinòlisi, i defectes en la funció plaquetària. Aquestes anormalitats podrien predisposar a tenir problemes d'aterotrombosi vascular (Yki-Järvinen H, 2004). PAI-1 és produïda pels hepatòcits i per les cèl·lules endotelials i pel teixit adipós visceral i és un inhibidor de la fibrinòlisi (Juhan-Vague I. i col., 1996). S'ha comprovat que la insulina pot estimular la producció de PAI-1. *In vitro* la insulina fa augmentar la producció de PAI-1 en hepatòcits HepG2 i en cultius primaris d'hepatòcits humans, però no en cèl·lules endotelials (Stern MP, 1997). Les concentracions plasmàtiques de l'antigen de PAI-1 solen ser elevades en la insulino-resistència associada a obesitat (Juhan-Vague I. i col., 1996). La disminuïda fibrinòlisi juga un paper important en la patogènia de la placa arterioscleròtica. El activador del plasminogen tissular (t-PA) catalitza la conversió de plasminogen a plasmina la qual catalitza la fibrinòlisi. PAI-1, que inhibeix el t-PA, és el principal determinant de la deficiència de fibrinòlisi, la qual afavoreix la formació de trombus. Així, la formació de trombus serà més freqüent en individus amb resistència a la insulina associada a l'obesitat. Pacients amb malaltia arterial coronària (CAD) tenen concentracions més elevades de PAI-1 respecte els controls (Stern MP, 1997). Així les concentracions de PAI-1 són un indicador de risc coronari (Juhan-Vague I. i col., 1996).



## **1.4. GENÈTICA I DM 2**

El desenvolupament de la DM 2 ve determinat per dos factors: genètics i ambientals. La base genètica de la DM 2 és heterogènia. La DM 2 es caracteritza per la presència de dues anormalitats bàsiques: problemes en la secreció d'insulina i disminució de la sensibilitat a la insulina (Kahn CR., 1994). Això significa que hi ha dues vies fisiopatològiques i, per tant, dos grups de gens que poden estar involucrats en la patogènesi de la DM 2. La importància del paper dels gens en aquesta patologia ve donada pels resultats d'estudis amb bessons monozygòtics amb una concordança més gran (entre 41% i 55%) en comparació amb bessons dizigòtics (entre un 10% i un 15%) (Harvald B. i col., 1983; i Newman B. i col., 1987).

La malaltia es podria dividir en dos grups: el tipus monogènic i el poligènic. El monogènic és a conseqüència de mutacions rares en un sol gen (McCarthy MI., 2002). Aquestes mutacions poden afectar l'estructura i conseqüentment la funció d'una proteïna. El tipus monogènic és caracteritzat per tenir una alta penetrància fenotípica, fet que significa que la presència de la mutació pràcticament determina el desenvolupament de la malaltia.

La DM 2 poligènica, multifactorial o complexa és el resultat de la interacció entre els factors ambientals i els genètics: amb la contribució de molts gens diferents (Cook JT. i col., 1994; i Rich SS, 1990). No obstant, el nombre final i la contribució relativa d'aquests gens és incerta i de fet, diferents loci poden participar en el desenvolupament de la DM 2. Alguns gens poden ser rellevants en algunes poblacions concretes o grups ètnics i en altres no. La susceptibilitat a patir aquestes formes complexes de DM 2 s'associa a polimorfismes freqüents que impliquen variacions d'aminoàcids en exons o que influencien en l'expressió de gens (McCarthy MI. i col., 2002; i McCarthy MI,

2002). Aquests polimorfismes s'han de considerar variants susceptibles, però no factors causants que inequívocament determinen la malaltia.

Els problemes per trobar gens candidats són la desconeixença de la funció de molts gens i la desconeixença de totes les vies implicades en l'acció i secreció d'insulina.

En la malaltia poligènica es busquen variants comunes que estan presents en el grup de pacients i controls.

S'estudien molts gens en relació a la DM 2 però n'hi ha un grup que té més que comprovada la seva influència en la susceptibilitat de la malaltia, i dels quals se n'ha estudiat alguns SNPs (*single nucleotide polymorphisms*). EL risc de desenvolupament de DM 2 està associat als següents gens:

- CAPN-10 (calpaïna 10) (haplotip format pels SNPs: -19, -43 i -63) (Hanis CL. i col., 1996)
- PPAR $\gamma$  (receptor-gamma activador de la proliferació de peroxisomes; SNP Pro12Ala) (Altshuler D. i col., 2000; i Hara K. i col.,2000)
- KCJN11 (subunitat Kir6.2 dels canals de potassi dependents d'ATP) (Gloyn AL. i col., 2001 i 2003; Hani EH. i col., 1998)
- GYS1 (glicogensintasa) (Broedl UC. i col., 2006)
- El gen de l'IRS-1 (Lehto M. i col., 1999)
- INS (proinsulina) (Broedl UC. i col., 2006)
- ABCC8 (*ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 8*) (receptor 1 de sulfonilurees) (Broedl UC. i col., 2006)
- SLC2A1 (*solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter)*) (Broedl UC. i col., 2006)
- També altres gens com:

- ADIPOQ (adiponectina) (Kondo H. i col., 2002), el gen de l'hemocromatosi heretada HFE (Moczulski DK. i col., 2001) i el gen de la IL-6
- Gen de HNF1 $\alpha$  (factor de transcripció hepàtic 1 alfa): mutació autosòmica dominant
- Gen de HNF4 $\alpha$  (polimorfisme del promotor d'aquest factor de transcripció) (Love-Gregory LD. i col., 2004; Silander K. i col., 2004; i Weedon MN. i col., 2004)
- Gens de la regió 20q13 com el gen PTP1 $\beta$  (proteïna tirosín-fosfatasa 1-beta) (Malecki MT. i col., 2005)
- Altres gens com el de la lamina (Wolford JK. i col., 2001), USF-1 (*upstream transcription factor-1*) (Pajukanta P. i col., 2004), KCNJ9 (*potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 9*) (influència en la secreció d'insulina) (Farook VS. i col., 2002) i APOA2 (apolipoproteïna A-II) (relacionat en el metabolisme de lípids) (Middleton-Price HR. i col., 1988), PCK1 i Pdx-1 (*homeobox-Ipancreàtic i duodenal*) (Shih DQ i Stollen M, 2001)

Donat que l'acció de la insulina involucra molts productes genètics, els defectes a la cèl·lula diana poden ser deguts a mutacions que afectin qualsevol proteïna entre el receptor i les proteïnes finals regulades per l'acció de la insulina. El locus del receptor de la insulina és el que ha acaparat més atenció. Aquestes mutacions es troben al gen estructural, més que no pas al promotor o als dominis no codificants, i determinen la disminució de l'ARNm del receptor, defectes al processament del proreceptor, alteració del transport dels receptors a la membrana cel·lular, acceleració de la degradació del

receptor, unió anormal de la insulina o disminució de l'activitat tirosina quinasa del receptor, entre altres defectes (Vidal-Puig A i Bjorbaek C, 1997).

L'estat d'insulino-resistència més comú a la població caucasiana és l'obesitat, per la qual cosa aquesta patologia constitueix l'entitat on millor s'ha avaluat el possible paper de la transmissió genètica sobre el seu desenvolupament. Els estudis de bessons idèntics, fills adoptats i famílies, suggereixen que del 40 al 80% de la variació en l'índex de massa corporal, es pot atribuir a factors genètics (Rankinen T. i col., 2002). Experiments de sobrealimentació en bessons idèntics suggereixen que la distribució dels compartiments de greix també es troba sota control genètic (Bouchard C. i col., 1990).

Els resultats més consistents, que suggereixen una associació entre les diferències de composició corporal i un polimorfisme genètic en humans, s'han obtingut amb una variant del receptor  $\beta_3$ -adrenèrgic i amb el PPAR- $\gamma$  (Deeb SS. i col., 1998). La variant del receptor  $\beta_3$ -adrenèrgic s'ha associat a un major índex de massa corporal en un estudi, al grau d'insulino-resistència en un altre i a un inici precoç de diabetis mellitus no insulíndependent en un tercer (Walston J. i col., 1995; Widen E. i col., 1995; i Clement K. i col., 1995). Altres gens candidats de dubtós significat són: el gen del receptor de glucocorticoides (Clement K. i col., 1996b; Rosmond R., 2002) que podria influenciar en el grau d'obesitat pel conegut paper que els glucocorticoides exerceixen permissivament en diferents estadis del balanç energètic; el gen *ob* (que codifica per la leptina), la possible associació del qual s'ha descrit en algunes poblacions obeses (Clement K. i col., 1996a); mutacions del receptor de la leptina, que també són rares (Heo M. i col., 2002) i d'una regió del cromosoma 1p22-p31, pròxima al gen del receptor de la leptina (Duggirala R. i col., 1996), que s'ha associat a l'obesitat. Més recentment, també s'han vist involucrats en el desenvolupament de l'obesitat i de la resistència a la insulina alguns polimorfismes del gen del factor de necrosi tumoral alfa

(TNF $\alpha$ ). Aquells subjectes homozigots per l'absència d'un lloc de restricció (com a resultat de la substitució d'una guanina per una adenina a la posició 308) en el promotor de TNF $\alpha$ , van presentar un augment del percentatge de greix corporal i resistència a la insulina (Dalziel B. i col., 2002; Fernández-Real JM. i col., 1997; i Valenti L. i col., 2002) i una associació amb l'obesitat (Herrmann SM. i col., 1998 i Brand E. i col., 2001), amb el contingut de greix (Hoffstend J. i col., 2000) i amb la glucèmia en dejú (Ishii T. i col., 2000). En estudis posteriors es va comprovar que els individus amb A en aquesta posició (-308A) també presentaven una tensió arterial més elevada i concentracions d'insulina en plasma més altes que els subjectes control. Així, segons aquest estudi, els individus -308A en el gen del TNF $\alpha$  tenen un 23% més de risc de desenvolupar obesitat que els subjectes control (Sookoian SC. i col., 2005).

El polimorfisme del gen del substrat-1 del receptor de la insulina (IRS-1), resultat de la substitució d'una arginina per una glicina al codó 972, determina, només en la població obesa, una disminució de la sensibilitat a la insulina associada a l'hipertrigliceridèmia (Clausen JO. i col., 1995).

Una investigació recent ha arribat a la conclusió que les variants genètiques que modulen l'acció insulínica podrien tenir un efecte en la susceptibilitat a patir DM 2 en presència d'obesitat, mentre que les variants genètiques que actuen sobre la secreció de la insulina podrien tenir un gran impacte en la susceptibilitat de patir DM 2 en individus primis.

Han observat associacions significatives entre la DM 2 i polimorfismes en els gens:

- HNF1 $\alpha$  (I27L)
- GCK (glucoquinasa; -30G>A)
- SLC30A8 (*solute carrier family 30 (zinc transporter) member 8*; R325W)

- TCF7L2 (transcription factor 7-like 2, rs7903146)

en individus no obesos.

I han comprovat associacions significatives entre la DM 2 i polimorfismes en els gens:

- PPARG (Pro12Ala)
- ADIPOQ (-11,377C>G)
- ENPP1 (*ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1*; K121Q)
- TCF7L2 (rs7903146)

en individus obesos (Cauchi S. i col., 2008).

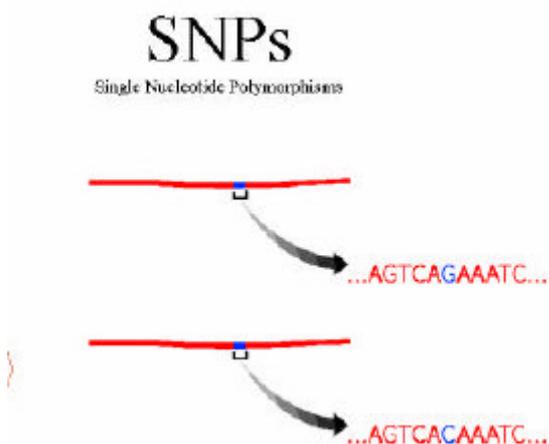
Alguns dels gens implicats en la DM 2 monogènica (MODY\*) són (Tusié MT, 2005; American Diabetes Association, 2008b):

- HNF4- $\alpha$  per MODY1
- Glucocinasa per MODY2
- HNF1- $\alpha$  per MODY3
- IPF-1 (factor 1 del promotor de la insulina) per MODY4
- Pdx-1 per MODY4 (es tracta d'un gen implicat en la formació del pàncrees, i en el metabolisme de la cèl·lula  $\beta$  adulta mitjançant la regulació de l'expressió de diferents gens (insulina, IAPP (*islet amyloid polypeptide*), glucoquinasa, Glut2 i FGFR1 (receptor 1 del factor de creixement dels fibroblasts) i gens mitocondrials (Grapin-Botton A. i col., 2001; i Shih DQ i Stoffel M, 2001)). En els illots adults Pdx-1 està regulat pels factors nuclears d'hepatòcits: HNF1 $\alpha$ , HNF4 $\alpha$  i HNF3 $\beta$  (Kawamori D. i col., 2003)).
- HNF1- $\beta$  per MODY5
- NeuroD1 (*neurogenic differentiation 1*) per MODY6

\* MODY és una forma monogènica de diabetis tipus 2 autosòmica dominant. És deguda a una alteració en la secreció d'insulina, habitualment sense resistència a la insulina. Es manifesta entre els 10 i els 60 anys d'edat. Els diferents fenotips observats en les MODY corresponen, bàsicament, a mutacions en factors de transcripció considerats fonamentals en el desenvolupament endodèrmic, tot i que no es coneix amb exactitud quines són les vies d'acció a través de les quals aquests factors de transcripció desencadenen el fenotip MODY.

#### **1.4.1. ELS POLIMORFISMES D'UN SOL NUCLEÒTID (SNPs)**

Un SNP és un petit canvi genètic, o variació, d'un sol nucleòtid, que s'esdevé en la seqüència d'ADN de persones diferents. Una variació d'un SNP s'esdevé quan un sol nucleòtid, per exemple *A* es canvia per un dels altres tres: *G*, *C*, o *T* (Figura 1.11.). La freqüència del canvi és superior a l'1%. És la variació del genoma més simple i més freqüent en humans. Són bial·lèlics (*C/T*) i la freqüència és de 1/300bp.



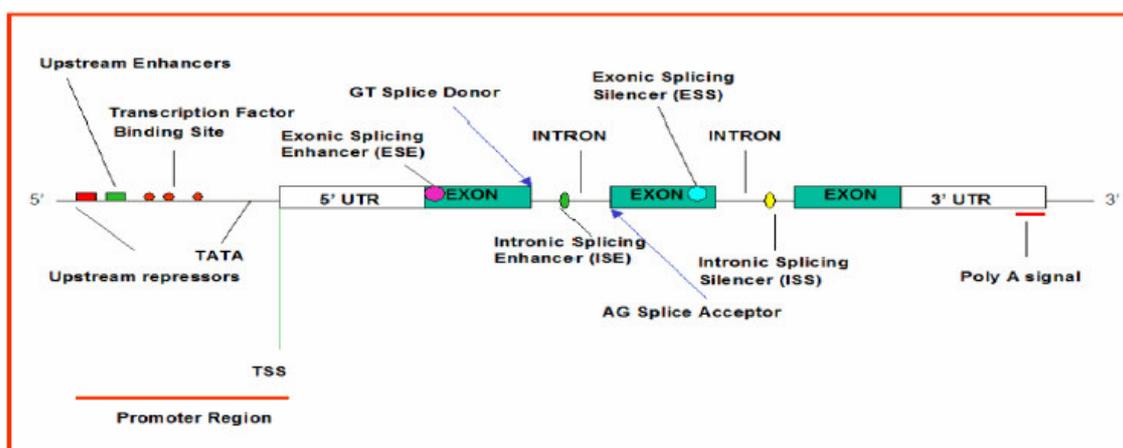
**Figura 1.11.** Exemple de SNP. *Genoma España, 2005.*

---

El genoma humà conté 10 milions de SNPs validats i 21 milions per validar.

Els SNPs tenen moltes utilitats (per l'estudi de susceptibilitat a malalties, pel diagnòstic i pronòstic de malalties, pel metabolisme de fàrmacs i per estudiar reaccions adverses a fàrmacs), però aquí bàsicament es centra l'estudi en la recerca de SNPs implicats en el desenvolupament de DM 2.

Els SNPs poden aparèixer en qualsevol posició dins i fora del gen. Segons la seva localització poden classificar-se en: intrònics, exònics, de regions promotores, etc... (Figura 1.12.).

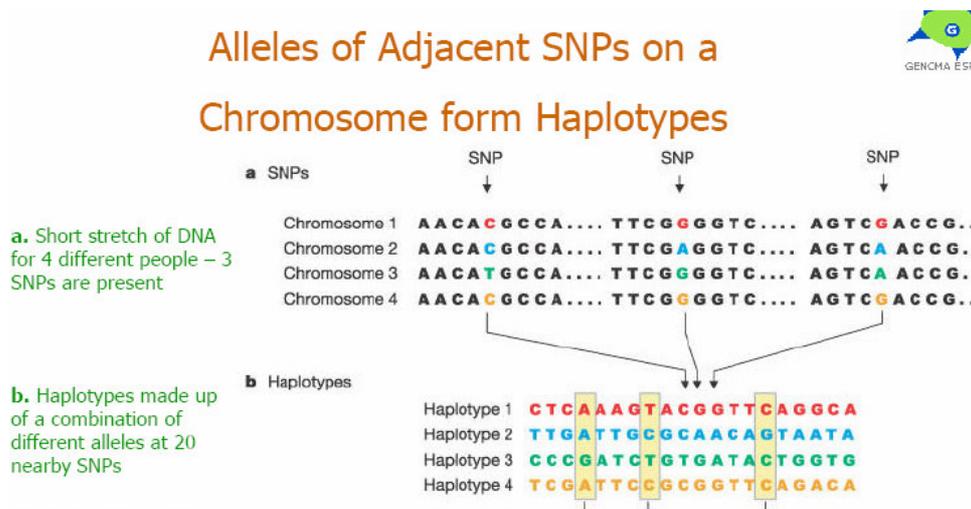


**Figura 1.12.:** Regions gèniques on es poden trobar els SNPs. *CEGEN, 2006.*

Els SNPs codificants poden classificar-se en dos subgrups: sinònims (no produeixen canvi d'aminoàcid) i no sinònims (produeixen canvi d'aminoàcid en el producte gènic). En principi es centra l'interès en els no sinònims ja que poden donar un canvi en l'estructura i funció de la proteïna d'interès.

També es busca si aquest SNP és el desencadenant principal de la funció a estudiar o si està en desequilibri de lligament amb un altre SNP.

I també interessa l'estudi dels haplotips que pot generar un SNP. Un haplotip és un conjunt d'al·lels que tendeixen a heretar-se junts (que no es separen fàcilment per recombinació) i es troben en un segment llarg d'ADN (Figura 1.13.).



**Figura 1.13.:** Exemple d'haplotip. *Genoma España, 2005.*

En aquest treball s'estudia un SNP de la proteïna SP-D. Es tracta d'un SNP validat per la casa comercial *Applied Biosystems*, això significa que està testat en la població caucasiana i que la freqüència dels al·lels és superior al 5%. És un SNP no sinònim ja que implica un canvi d'aminoàcid en la proteïna resultant.



## **INTRODUCCIÓ A LES PROTEÏNES OBJECTE D'ESTUDI EN AQUESTA TESI**

Els últims anys s'ha vist que en la diabetis tipus 2 hi ha una reacció de fase aguda associada a citoquines, que forma part de la resposta immunitària innata.

En aquesta tesi es planteja que alguns dels mecanismes involucrats en la resposta de fase aguda poden contribuir en la fisiopatologia de la diabetis mellitus tipus 2 o de la síndrome metabòlica, incloent la intolerància a la glucosa, la resistència a la insulina, la deficient secreció d'insulina, la dislipidèmia, la hipertensió, l'arteriosclerosi i l'obesitat central.

En aquest sentit, i tenint en compte que la diabetis tipus 2 és poligènica amb influència de factors medioambientals, s'ha volgut estudiar proteïnes (i els seus gens) pro- i antiinflamatòries susceptibles d'estar relacionades amb la síndrome metabòlica i la funció vascular. El que es pretén és poder identificar noves proteïnes i gens de susceptibilitat al desenvolupament de diabetis mellitus tipus 2. I la utilitat de l'estudi és el futur disseny de mètodes de diagnòstic per la població de risc a patir la malaltia i la identificació de noves dianes terapèutiques en la DM 2.

El treball s'ha centrat en quatre proteïnes: l'SP-D, l'SP-A, les  $\alpha$ -defensines i la visfatina. S'ha escollit l'SP-D (proteïna surfactant D) i l'SP-A (proteïna surfactant A) per ser proteïnes que pertanyen a la família de les lectines tipus C igual que la proteïna antiinflamatòria MBL (lectina d'unió a manoses). El seu estudi interessa, també, perquè són proteïnes pulmonars que actuen en la immunitat innata i per la relació establerta coneguda entre funció pulmonar i diabetis tipus 2.

Les defensines també pertanyen a la resposta immunològica innata per les seves propietats antimicrobianes. Les alfa-defensines, en concret, activen la via clàssica del

sistema de complement i també indueixen la síntesi de citoquines. A més, el seu interès també es centra en estudis previs que relacionen aquestes proteïnes amb el metabolisme del colesterol i la funció vascular.

Al 1999 Hotamisligil i col·laboradors varen comprovar com el TNF $\alpha$  podia induir resistència a la insulina. Era la primera vegada que es verificava com una citoquina proinflamatòria i produïda pel teixit adipós podia induir resistència a la insulina. A partir d'aquí s'observà que quan s'expandia el teixit adipós també augmentaven algunes adipocitokines. Una d'elles és la visfatina, una proteïna a la qual se li han atribuït funcions immunològiques i sobre el metabolisme de la glucosa. Per tots aquests motius, i pel fet de ser una proteïna sobre la qual hi ha pocs estudis publicats ha interessat aprofundir més sobre la seva biologia. Alguns autors han considerat la visfatina com a un marcador proinflamatori, la producció de la qual està desencadenada per l'augment dels macròfags en la grassa visceral d'individus obesos (Zhang Y-Y. i col., 2006). La seva relació amb les citoquines també la fa una proteïna de gran interès ja que algunes citoquines com la IL-1, la IL-6 i el TNF $\alpha$  augmenten significativament l'expressió de visfatina en les cèl·lules de l'epiteli (Ognjanovic S. i col., 2001). Per altra banda, la visfatina augmenta l'expressió de la IL-6 i la IL-8, suggerint una complexa interacció entre la visfatina i altres citoquines inflamatòries (Ognjanovic S i Bryant-Greenwood GB, 2002).

## **1.5. SP-D: PROTEÏNA SURFACTANT D**

També anomenada apoproteïna del surfactant pulmonar (PSP-D), proteïna D associada al surfactant pulmonar (SP-D), proteïna pulmonar 4 associada al surfactant (SFTP 4), o bé col·lectina 7 (COLEC7).

### **1.5.1. ESTRUCTURA DE LA PROTEÏNA**

El surfactant pulmonar és una complexa mescla de fosfolípids (90%) i proteïnes (5-10%) essencials per assegurar la funció respiratòria, situats a la fase líquida mòbil que cobreix la gran àrea superficial de l'epiteli alveolar. Les proteïnes surfactants SP-B (SFTP3; 178640) i SP-C (SFTP2; 178620) i els lípids surfactants estan involucrats en la reducció de la tensió superficial a nivell de la barrera d'aire-líquid en els alvèols pulmonars, mentre que les proteïnes surfactants SP-A (SFTP1; 178630) i SP-D (SFTP4; 178635) contribueixen a la defensa immunitària local mitjançant la fagocitosi (Weaver TE i Whitsett JA, 1991; i Kishore U i Reid KBM, 2001).

L'SP-D, l'SP-A i l'MBL són col·lectines, és a dir, membres de la família de les lectines tipus C (Lu J. i col., 2002; i Holmskov U. i col., 2003). Les col·lectines estan compostes per 4 dominis:

- Una regió curta aminoterminal amb enllaços disulfurs intercatenaris.
- Un domini llarg triple hèlix tipus col·lagen (ja que presenten una gran concentració de glicina (22%), d'hidroxiprolina, i d'hidroxilisina en la seva composició aminoacídica) compost per 8 triplets de repetició Gly-Xaa-Yaa de

179-202 residus al N-terminal. La regió de col·lagen (CLR) pot interactuar amb molècules receptores presents en diferents cèl·lules immunitàries.

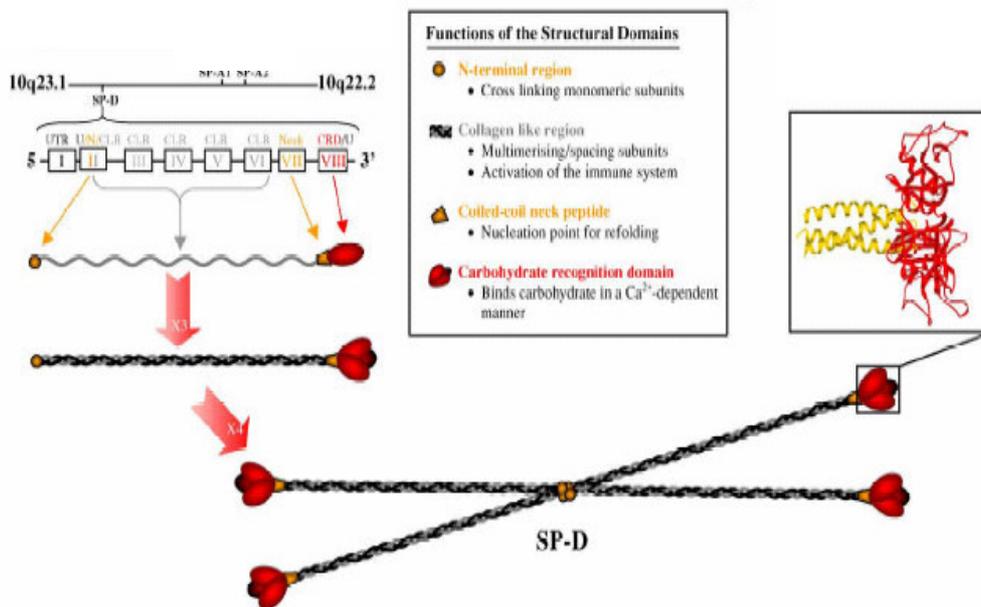
- Una regió en coll d'espiral  $\alpha$ -helicoidal de 203-235 residus (*helical coiled-coil neck*).
- Un domini globular de reconeixement de carbohidrats (CRD) o tipus C-lectina calci-dependent en el C-terminal de 236-355 residus (Hakansson K. i col., 1999; i Shrive AK. i col., 2003) (Figura 1.5.2. i Figura 1.5.3.). El CRD pot reconèixer carbohidrats o patrons de càrrega de microorganismes, al·lèrgens o cèl·lules mortes.

L'estructura bàsica d'aquestes col·lectines és el trímer (format per les cadenes A, B i C) constituït per la triple hèlix tipus col·lagen que manté la forma, la dimensió, l'estabilitat i l'oligomerització de la proteïna (Kishore U. i col., 2004).

L'SP-D humana està formada per la unió de quatre subunitats d'homotrímer per formar una estructura tetramèrica de 520 kDa. Cada homotrímer té 130 kDa i conté tres cadenes polipeptídiques idèntiques de 43 kDa cada una de les quals conté una estructura d'oligosacàrid unida en N a la posició Asn<sup>70</sup>. Presenta unions Ca(2+)-dependents amb afinitat per la maltosa (Holmskov i col., 2003).

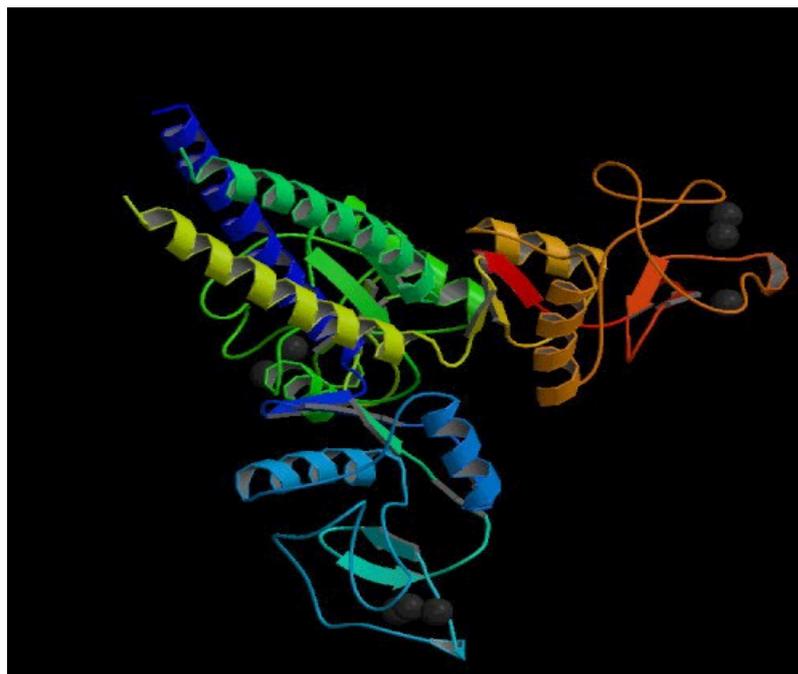
1	mllfllsalv	lltqplgyle	aemktyshrt	mpsactlvmc	ssvesglpgr	dgrdgregpr
61	gekqdpplpg	aagqagmpgq	agpvqpkgn	gsvgepgpkq	dtgpsgppgp	pgvpppagre
121	galgkqgnig	pqqkpgpkge	agpkgevgap	gmqgsagarg	lagpkgergv	pgergvpgnt
181	gaagsagamg	pqgspgargp	pglkgdkgip	gdkgakgesg	lpdvaslrqq	vealqgqvqh
241	lqaafsqqyk	velfpngqsv	gekifktagf	vkpfteaql1	ctqaggqlas	prsaenaal
301	qqlvvaknea	aflsmtdskt	egkftyptge	slvysnwapg	epnddgsed	cveiftngkw
361	ndracgekrl	vvcef				

**Figura 1.5.1.** : Seqüència d'aminoàcids de l'SP-D. *NCBI, 2008.*



**Figura 1.5.2.:** Estructura proteica i del gen de l'SP-D. L'exó I codifica per un 5'UTR (negre); l'exó II codifica una part de 5'UTR, per la regió de cisteïnes N-terminal (taronja) i una part de la CLR (gris); de l'exó III al VI codifica per la CLR; l'exó VII codifica la regió de coll d'espiral hèlix- $\alpha$  (taronja); i l'exó VIII codifica el CRD (vermell). Tres cadenes polipeptídiques es combinen per formar una estructura trimèrica que combina amb unes altres tres estructures similars per donar a l'SP-D la característica estructura de forma de creu. *Kishore U. i col., 2006.*

L'SP-D està composta per 375 aminoàcids (Figura 1.5.1.), dels quals 25 formen part del segment N-terminal (codons [21-45]), 177 de la regió de col·lagen (codó [46-222]), 28 de la regió en coll d'espiral (codó [223-250]), i 125 del domini de lectina tipus C (CTLD) (codó [251-375]) (Wang G. i col., 2004).



***Figura 1.5.3:*** Estructura tridimensional d'un fragment de l'SP-D. És un fragment trimèric amb dominis tipus lectina i el coll d'espiral hèlix- $\alpha$ . El disseny de la proteïna s'ha fet amb difracció de raig X. Wang L. i col., 2008.

### **1.5.2. LOCALITZACIÓ DE L'SP-D**

El pulmó és el lloc principal de síntesi de SP-D. La síntesi es localitza a les cèl·lules Clara, als pneumòcits tipus II, a les cèl·lules de les glàndules traqueobronquials i a la capa perifèrica de cèl·lules en forma de calze i a les vies respiratòries proximals (Saitoh H. i col., 1998; Madsen I. i col., 2000 i 2003; i Kasper M. i col., 2002). També s'ha detectat SP-D en teixits mesotelials (mesenteri, peritoneu i pleura) (Chailley-Heu B. i col., 1997). De fet, els cossos lamel·lars (grànuls d'emmagatzematge des dels quals es secreta el surfactant alveolar) es troben al pulmó (als pneumòcits tipus II) i també al mesoteli (peritoneu, pleura i pericardi) (Dobbie JW, 1996). Es localitza també la transcripció de l'SP-D i/o SP-A en cèl·lules sinovials, a les trompes d'Eustaqui i sinus,

al tracte gastrointestinal, a les glàndules lacrimals, a les glàndules salivals, al pàncrees, al conducte biliar, a les cèl·lules parietals de l'estómac, a les criptes de Lieberkühn, als túbuls renals, a la pituitària anterior i al miocardi (Dobbie JW. i col., 1994; Miyamura K. i col., 1994; Rubio S. i col., 1995; Eliakim R. i col., 1997; Madsen J. i col., 2000 i 2003; Paananen R. i col., 2001; van Rozendaal BA. i col., 2001; Stahlman MT. i col., 2002; Leth-Larsen R. i col., 2004; i MacNeill C. i col., 2004). Recentment s'ha localitzat l'SP-D a l'endoteli (Sørensen GL. i col., 2006).

En general, l'SP-D s'ha considerat una proteïna de superfície associada a secrecions exocrines i a la superfície de mucoses. Però la presència de SP-D en teixits com el múscul, la pell i l'endoteli indica que té altres funcions a part de les relacionades amb la immunitat a les mucoses.

### **1.5.3. FUNCIONS DE L'SP-D**

L'SP-D la podem trobar a la regió extracel·lular, al citoplasma de la cèl·lula, al lisosoma i a la vesícula endocítica. No es coneix massa bé el seu origen vascular però sembla ser que va dels pulmons a la sang ja que en determinades patologies pulmonars augmenta la concentració de SP-D en sang (Leth-Larsen R. i col., 2003).

Les lectines tipus-C animals estan involucrades en l'organització de la matriu extracel·lular, en l'endocitosi, en l'activació del complement, i encaminen el reconeixement dels patògens i les interaccions cèl·lula-cèl·lula. Algunes lectines com les proteïnes d'unió a mannososa, les proteïnes surfactants pulmonars i els receptors de mannososa de la superfície dels macròfags, s'uneixen als residus dels monosacàrids terminals característics de la superfície cel·lular de bacteries i fongs (Kishore U. i col., 2005). L'SP-A i l'SP-D es poden unir a varietat de lligands carbohidratats incloent la

mannosa, la glucosa i la maltosa, i l'SP-D és específica per la galactosa i l'N-acetilgalactosamina (GlcNAc) (Haurum JS. i col., 1993; i Nadesalingam J. i col., 2003).

L'SP-D juga un paper molt important en la immunitat i en el metabolisme surfactant.

L'SP-D preferentment s'uneix al fosfatidilinositol (PI) com també a la glucosilceramida, que són components menors del surfactant que contenen dominis de sucres. Els CRDs de l'SP-D s'uneixen al domini glucosil de la glucosilceramida mentre que la interacció del domini inositol del PI s'esdevé pel lloc d'unió a manoses (Ogasawara Y. i col., 1992).

#### **1.5.3.1. Funcions respiratòries**

Intervé en el desenvolupament dels alvèols pulmonars, en l'homeòstasi surfactant (Leth-Larsen R. i col., 2005), en l'intercanvi de gasos en la respiració, en la regulació de la tensió del líquid de superfície, en el metabolisme de l'oxigen i de les espècies reactives d'oxigen (Kishore U. i col., 2005).

L'SP-D suprimeix la peroxidació dels lípids ja que protegeix els fosfolípids surfactants i els macròfags de l'estrès oxidatiu de l'oxigen, de la pol·lució aèria, i de la inflamació pulmonar (Bridges JP. i col., 2000).

#### **1.5.3.2. Funcions immunitàries**

- L'SP-D reconeix el domini de sucres de bacteries i altres patògens i reconeix agents al·lèrgens; intervé en la quimiotaxi dels macròfags, en la resposta del sistema immunitari innat (Leth-Larsen R. i col., 2005); pot interactuar amb cèl·lules del sistema immunitari i modular les seves propietats fagocítiques, quimiotàctiques, oxidatives i de presentació d'antigen en resposta a patògens, al·lèrgens, a cèl·lules apoptòtiques i necròtiques; intervé en l'endocitosi

mitjançant receptor, en la resposta humoral antimicrobiana, i en la regulació negativa de la interleuquina-2 (Kishore U. i col., 2005). Estimula la secreció de l'antiinflamatori TGF- $\beta$ 1 dels macròfags alveolars (Reid MF i Wright JR, 2002). També controla la inflamació pulmonar: afavorint la inhibició que exerceixen les citocines en resposta als LPS, induint la producció de TNF- $\alpha$  i CSF per part dels macròfags alveolars (Song M i Phelps DS, 2000) i afavorint la producció de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 i IFN- $\gamma$  de les PBMCs humanes (Borron PJ. i col., 1998; i Wright JR, 2005); també regula la inflamació induïda pels LPS (Quintero OA. i col., 2002).

- L'SP-D suprimeix la producció d'histamines des dels basòfils i els mastòcits (Wang G. i col., 1996; i Madan T. i col., 1997); té un efecte antiproliferatiu sobre els limfòcits B i T (Wang G. i col., 1996); i modula la maduració i la presentació d'antigen de les cèl·lules dendrítiques. L'SP-D, a més, polaritza les cèl·lules T col·laboradores (*helper*) ja que suprimeix les cèl·lules Th2 i s'encarrega de la regulació subseqüent de les citocines Th2 (Madan T. i col., 2001; Singh M. i col., 2003; i Brinker KG. i col., 2001 i 2003); regula la producció de citocines com la citocina Th1 (Madan T. i col., 2001; Singh M. i col., 2003) i modula l'expressió de superfície del *toll-like receptor-4* (Schaub B. i col., 2004).

A continuació es desenvolupa més àmpliament algunes d'aquestes funcions immunitàries:

### **I. Reconeixement de patògens mitjançant SP-D**

L'SP-D és una molècula que reconeix un patró de carbohidrats i interactua amb glicoconjugats i lípids de la superfície de microorganismes a través dels seus CRDs (Weis WI. i col., 1998). El reconeixement dels patògens mitjançant SP-D es realitza a través de la unió del residu monosacàrid terminal present en molts patògens pulmonars. S'uneix a residus de mannososa, glucosa, maltosa i GlcNAc (Nadesalingam J. i col., 2003), els quals són part de molts lligands microbials, i s'hi uneix amb més habilitat que als residus de galactosa, fructosa i àcid siàlic que solen ser els components més comuns de les glicoproteïnes de la majoria d'eucariotes.

#### ***Ia. Interacció de l'SP-D amb virus***

Té propietats antivirals ja que propicia la inactivació i l'agregació viral; desencadena la fagocitosi per part dels macròfags i neutròfils alveolars i propicia l'explosió superoxidativa dels neutròfils (Hartshorn KL. i col., 1996).

La interacció de l'SP-D amb diferents soques del virus Influença A (IAV) apareix dependent de les estructures de l'hemaglutinina expressada en la superfície (HA), de la neuraminidasa i els seus nivells de glicosilació. Quan l'IAV entra als pulmons disminueix l'activació dels neutròfils, i entra a les cèl·lules hoste mitjançant la unió de la molècula trimèrica HA amb els residus d'àcid siàlic de la superfície de les cèl·lules epitelials. L'SP-D indueix una massiva agregació de partícules d'IAV, inhibeix l'activitat de HA i de la neuraminidasa i neutralitza les partícules víriques (Hartshorn KL. i col., 1996). Les propietats anti-IAV de l'SP-D depenen de la glicosilació de HAN165, la qual tanca al virus l'accés dins la cèl·lula (Hartshorn KL. i col., 1994; Reading PC. i col., 1997; i Hawgood S. i col., 2004).

L'SP-D s'uneix a la proteïna G del virus respiratori sincitial (RSV) i inhibeix la infecció viral tant *in vitro* com *in vivo* (Ghildyal R. i col., 1999). També reconeix els rotavirus (Gupta G i Surolia A, 2007).

#### ***Ib. Interacció de l'SP-D amb bacteris***

Presenta propietats antibacterianes mitjançant els mateixos mecanismes que en virus i perquè propicia la producció d'espècies del nitrogen i dona resistència a les cèl·lules no fagocítiques per tal que no hi entrin bacteris. L'SP-D s'uneix a les estructures carbohidratades de la superfície d'un ampli espectre de bacteris grampositius i gramnegatius. L'SP-D s'uneix als LPS de *K. pneumoniae* (gramnegatiu) (Sahly H. i col., 2002), a l'àcid lipotenoic de *Bacillus subtilis* i al peptidoglicà de *S. aureus* (grampositius) (van de Wetering JK. i col., 2001), i al LPS purificat de *P. aeruginosa* i *E. coli* (Kishore U. i col., 1996).

També s'uneix al domini *lipoarabinomannan* de la superfície del bacil *M. tuberculosis* (Ferguson JS. i col., 1999 i 2002).

L'SP-D és una inhibidora del creixement microbià ja que augmenta la permeabilitat de la membrana bacteriana i indueix l'entrada d'aigua dins la cèl·lula. Aquest efecte s'ha comprovat en bacteris gramnegatius (Pikaar JC. i col., 1995; i van Iwaarden JF. i col., 1994) incloent soques d'*E. coli*, *K. pneumoniae*, i *Enterobacter aerogenes*. Aquesta activitat antimicrobiana es podria trobar parcialment al domini CRD (Kishore U. i col., 2005).

#### ***Ic. Interacció de l'SP-D amb llevats i fongs***

Té propietats antifúngiques mitjançant els mateixos mecanismes que en virus i bacteris. També retarda el temps de creixement dels fongs; i inhibeix el creixement de les hifes i

pseudohifes (Warn i col., no publicat). L'SP-D s'uneix a la forma salvatge de *Saccharomyces cerevisiae* via el seu CRD, tan bé com als llevats mutats amb menys *mannosyl-fosfat* a la paret cel·lular (Allen MJ. i col., 2001), i s'uneix als  $\beta$ -glucans de *Pneumocystis*. També s'uneix a *Candida albicans* i inhibeix el creixement de les hifes i pseudohifes i l'activitat de la macrofàgia alveolar (van Rozendaal BAWM. i col., 2000). També s'uneix a *Pneumocystis carinii* ja que interacciona amb la gpA, una glicoproteïna rica en mannososa i glucosa expressada en cists i trofozoïts (Zimmerman PE. i col., 1992). L'SP-D, a més, aglutina les formes patogèniques acapsulades de *Cryptococcus neoformans* (Kishore U. i col., 2005).

En el llevat *Histoplasma capsulatum* s'ha observat un mecanisme d'alteració de la permeabilitat membranar, protagonitzat per l'SP-D (McCormack FX. i col., 2003).

També té un efecte directe sobre *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. flavus* i *A. terreus* ja que inhibeix la germinació del conidi i el creixement de les hifes (Kishore U. i col., 2005).

## **II. Paper de l'SP-D en la resistència a la inflamació al·lèrgica i en la hipersensibilitat**

L'SP-D dóna resistència als al·lèrgens i hipersensibilitat pulmonar perquè reconeix el patró de les glicoproteïnes d'agents al·lèrgens (Wang JY. i col., 1996; i Madan T. i col., 1997).

L'SP-D fa un escombrat d'al·lèrgens, inhibeix el *cross-linkin* al·lèrgen-IgE i la producció d'histamina, suprimeix l'activació de la sensibilització dels basòfils, dels mastòcits o eosinòfils, suprimeix la proliferació de les cèl·lules B i T; i modula les cèl·lules dendrítiques i els macròfags, i la polarització de les cèl·lules Th (Kishore U. i col., 2002). L'SP-D suprimeix la proliferació dels limfòcits B ja que disminueix les concentracions d'IgG i d'IgE. També, si es disminueixen les concentracions d'IL-2 es pot inhibir la proliferació dels limfòcits B ja que la IL-2 permet el creixement i la

diferenciació dels limfòcits. La IL-5 és un factor diferenciador d'eosinòfils i la IL-4 i la IL-13 són factors importants per la diferenciació de les isoformes dels limfòcits B que condueixen a la secreció d'IgG i IgE. Aquestes citoquines marquen la resposta de les cèl·lules Th2 en la reacció al·lèrgica immunitària que es caracteritza per la secreció d'IL-4, IL-5, IL-10 i IL-13 i genera una resposta immunitària humoral (Kishore U. i col., 2005).

L'SP-D s'uneix als àcars de la pols de les cases (*Dermatophagoides pteronyssinus*), a les glicoproteïnes d'al·lèrgens, a la gp55 i gp45 d'*A. fumigatus*; inhibeix la unió específica de les glicoproteïnes dels al·lèrgens a la IgE; i bloqueja la producció d'histamina induïda des dels basòfils potenciada per la presència de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Derp.) i *A. fumigatus* (Wang JY. i col., 1996 i 1998; Madan T. i col., 1997).

També s'ha demostrat que l'SP-D desencadena la unió, agregació i fagocitosis de grànuls de midó que contenen al·lèrgens de pol·len derivats de *Dactylis glomerata* i *Phleum pratense* per mitjà dels macròfags alveolars. (Erpenbeck VJ. i col., 2004).

S'ha vist que l'SP-D redueix la proliferació de cèl·lules mononucleades de la sang perifèrica (PBMCs) en nens asmàtics sensibles a Derp. (Wang JY. i col., 1998), i que té un efecte supressiu en la secreció d'IL-2 per part de les PBMCs (Borron PJ. i col., 1998).

### **III. Funcions extrapulmonars de l'SP-D**

La presència de SP-D en sèrum i en altres teixits extra-pulmonars podria indicar un paper molt important en la immunitat innata fora dels pulmons, mitjançant la secreció de SP-D per part de les cèl·lules epitelials cap a les superfícies luminals per fer-la arribar cap a molts òrgans.

**IIIa. Funció de l'SP-D a l'epiteli gàstric**

L'SP-D es localitza, també, a la superfície luminal i dins les cavitats de la mucosa gàstrica humana, amb una màxima expressió a la superfície (Murray E. i col., 2002).

L'SP-D es troba més expressada en la mucosa gàstrica durant una gastritis associada a *Helicobacter pylori* (Kishore U. i col., 2005).

**IIIb. Funció de l'SP-D a nivell d'aparell genital**

S'ha localitzat SP-D en cèl·lules epitelials associades a la mucosa del tracte genitourinari (Murray E. i col., 2002). En les dones l'SP-D es troba a les cèl·lules de la teca i cèl·lules de la granulosa dels fol·licles ovàrics, i a les cèl·lules de la teca-luteïna i cèl·lules de la granulosa del cos luti (Leth-Larsen R. i col., 2004). També és present a l'epiteli luminal de les trompes de Fal·lopi, a les cèl·lules epitelials de les glàndules, al cervix uterí i a les cèl·lules de l'epiteli escamós de la vagina. Durant el cicle menstrual l'SP-D es localitza a l'endometri durant la fase secretora però no en la fase proliferativa (Leth-Larsen R. i col., 2004). La seva presència a les trompes de Fal·lopi podria explicar la seva involucració en el transport de l'esperma i de l'òvul i en la fertilització. Això fa pensar que l'SP-D té una funció de defensa local, especialment durant la fase secretora del cicle ja que aleshores cal protegir l'úter davant la possible implantació de l'embrió (Oberley RE. i col., 2004). S'ha demostrat que l'SP-D desencadena la fagocitosi de patògens com *Clamídia* mitjançant cèl·lules macrofàgiques. L'SP-D, a més, inhibeix la infecció de *Chlamydia trachomatis* a les cèl·lules de l'epiteli cervical (Oberley RE. i col., 2004).

L'SP-D es pot detectar en líquid amniòtic a les 26 setmanes de gestació. Es localitza en l'epiteli amniòtic i la membrana coriònica, i a la capa coriòdecidual de l'úter en l'etapa tardana de l'embaràs (Miyamura K. i col., 1994). És probable que estigui involucrada en

el reconeixement i eliminació de patògens de les membranes fetals i líquid amniòtic mitjançant les cèl·lules de l'amni i els macròfags de la decídua (Malhotra R. i col., 1994).

L'activitat del part humà està associada a un augment de la producció de prostaglandina  $F_{2\alpha}$  ( $PDF_{2\alpha}$ ) per part dels teixits intrauterins i per un estímul del factor proinflamatori  $TNF-\alpha$  (Norwitz ER. i col., 1992a i b). Com a moduladora de la inflamació, l'SP-D podria suprimir la secreció de  $TNF-\alpha$  per part dels macròfags de la decídua i així es retarda el part induït per la via de les prostaglandines (Kishore U. i col., 2005).

Per últim, és necessari destacar la seva funció com a remodeladora tissular ja que junt amb la decorin (un proteoglicà abundant en la membrana fetal i en el cèrvix uterí) copurifica a nivell del líquid amniòtic humà, i tenen una relació inversa pel què fa a les seves concentracions. La decorin indueix l'expressió de les MMP (metal·loproteases) i trenca les fibril·les de col·lagen per facilitar la maduració cervical i la dilatació durant el part; i també pot estar involucrada en la regulació de la força extensible de les membranes fetals al final de l'embaràs. La interacció SP-D-decorin pot tenir un paper en la remodelació del teixit intrauterí durant el part, i probablement en el control de la inflamació durant l'embaràs (Nadesalingam J. i col., 2003; i Groeneveld TWL. i col., 2005).

### ***IIIc. Funció de l'SP-D a les secrecions i líquids biològics***

L'SP-D es localitza en molts fluids biològics i secrecions com el sèrum (Doyle IR. i col., 1995), el líquid amniòtic (Miyamura K. i col., 1994; i Cho K. i col., 1999), en esputs, tant en estat normal com en estat de malaltia.

L'SP-D detectada a les llàgrimes té un efecte protector contra la invasió de *Pseudomonas aeruginosa* a les cèl·lules epitelials de la còrnia (Ni M. i col., 2005).

#### **1.5.4. MOLÈCULES DE SUPERFÍCIE CEL·LULAR QUE INTERACCIONEN AMB L'SP-D**

S'ha observat, *in vitro*, que l'SP-D actua suprimint o desencadenant inflamació dependent de la molècula de superfície a la qual s'uneix.

##### **1.5.4.1. La Glicoproteïna 340 (gp-340)**

La Gp-340 és la molècula calcidependent que s'uneix a l'SP-D. La unió entre la gp-340 i l'SP-D és una interacció proteïna-proteïna com una interacció lectina-carbohidrat i a través del domini CRD de l'SP-D. La Gp-340 es troba tant en forma soluble com associada a les membranes dels macròfags alveolars, però actua més com a opsonina soluble, i la seva unió a l'SP-D estimula la migració dels macròfags alveolars (Tino MJ i Wright JR, 1999). S'ha arribat a la conclusió que la interacció entre l'SP-D i la gp-340 juga un paper molt important en la immunitat innata a la superfície de les mucoses (Kishore U. i col., 2005).

##### **1.5.4.2. CD14**

El CD14 es troba als macròfags alveolars i la seva unió a l'SP-D modula la interacció CD14-LPS; i la unió SP-D-CD14 modula la producció de citokines proinflamatòries (Kishore U. i col., 2005). En aquesta unió participa directament el domini tipus lectina de l'SP-D; l'SP-D reconeix el component carbohidrat de CD14 (Sano H. i col., 2000).

##### **1.5.4.3. Complex Calreticulín-CD91**

Quan la calreticulina (CRT) s'uneix a la regió de col·lagen de l'SP-D utilitza el receptor endocític CD91 com un adaptador molecular per la fagocitosi i per la transducció de

senyal (Ogden CA. i col., 2001; Vandivier RW. i col., 2002; i Gardai SJ. i col., 2003). La seva unió estimula la fagocitosi i la producció de citoquines proinflamàtores (Figura 1.6.3.).

#### **1.5.4.4. SIRP $\alpha$ (Proteïna $\alpha$ reguladora de senyal) (CD172)**

L'SP-D s'uneix a la SIRP $\alpha$  a través del domini CRD per iniciar una via que inhibeix la producció de les citoquines proinflamàtores. Però, per altra banda, s'uneix als patògens a través dels CRDs i estimula la fagocitosi i la resposta proinflamàtoira (Gardai SJ. i col., 2003).

La SIRP $\alpha$  la trobem a les cèl·lules mieloides, a les neurones, a les cèl·lules endotelials, a les cèl·lules B i a les cèl·lules presentadores d'antigen (Figura 1.6.3.).

La unió de l'SP-D a la SIRP $\alpha$  activa la tirosín fosfatasa SHP-1. L'SHP-1 modula la supressió de gens proinflamatoris mitjançant el bloqueig de la via de senyalització mitjançant les quinases de la família Src i la *p38 mitogen-activated protein kinase* (Gardai SJ. i col., 2003).

#### **1.5.4.5. TLR2 i TLR4**

L'SP-D s'uneix als dominis extracel·lulars del TLR2 i del TLR4 a través del seu CRD (Ohya M. i col., 2006). Es tracta d'una unió calcidependent.

Els TLR són proteïnes de membrana tipus I que tenen un domini extracel·lular amb dominis de repetició rics en leucina (Hyakushima N. i col., 2004). Es creu que l'SP-D reconeix aquests dominis rics en leucina dels TLR2 i TLR4 (Ohya M. i col., 2006).

El mecanisme d'unió de l'SP-D al TLR2 i al TLR4 és diferent a la unió que s'estableix entre l'SP-D i PI o als LPS (Ohya N. i col., 2006).

### **1.5.5. SP-D I DIABETIS**

Diversos estudis mostren l'existència de relacions potencials entre malaltia pulmonar i diabetis tipus 2. De fet, en aquests estudis es considera que les mesures de funció pulmonar disminueixen ja alguns anys abans del diagnòstic de la diabetis, de manera que aquest empitjorament de la funció pulmonar podria estar mostrant canvis histològics preliminars en els pulmons dels pacients diabètics. Aquests canvis podrien ser considerats com a marcadors de risc per la DM 2 (Davis WA. i col., 2004). Se sap que la inflamació és present en la malaltia pulmonar i encara no s'ha evidenciat quins són exactament els indicadors d'inflamació als quals s'associa la malaltia pulmonar i que també poden contribuir a actuar com a marcadors de risc per DM 2 (Engström G. i col., 2002).

En estudis d'homes i dones de mitjana edat i sense malaltia pulmonar coneguda, una disminució de la capacitat vital prediu el desenvolupament de diabetis tipus 2. En 1.050 homes sans no diabètics es va veure que una disminuïda capacitat vital forçada (FVC), un disminuït volum espiratori forçat al primer segon (FEV<sub>1</sub>), i un baix flux midespiratori prediu hiperinsulinèmia i resistència a la insulina 20 anys després, independent de l'edat, la massa adipocitària i el fet de fumar (Lazarus R. i col., 1998).

Els mecanismes possibles per hipotetitzar aquesta relació inclouen els efectes de la hipoxèmia sobre la regulació de la glucosa i la insulina (Larsen JJ. i col., 1997; i Braun B. i col., 2001), les exposicions adverses en la vida prematura i els seus efectes en el desenvolupament dels òrgans (Hales CN. I col., 1991; i Barker DJ. i col., 1991), i mediadors inflamatoris relacionats amb el pulmó i els seus efectes sobre la cascada de senyalització de la insulina (Hjalmarsen A. i col., 1996; Schmidt MI. i col., 1999; i Semenza GL. i col., 2000). De fet, recentment, Yeh HC. i col·laboradors han revisat el

fet que el factor nuclear de la interleuquina-6, el *early growth response-1* i el factor-1 induït per hipòxia donen resposta inflamatòria davant una hipòxia crònica a nivell macrofàgic, d'endoteli vascular pulmonar i musculatura llisa (Semenza GL. i col., 2000).

El fet de fumar s'ha establert com un factor independent predictor de diabetis tipus 2 (Wannamethee SG. i col., 2001; Manson JE. i col., 2000), provoca resposta inflamatòria (Zalokar JB. i col., 1981) i està inversament associat a la capacitat vital. No obstant, el lligam entre la disminució de la capacitat vital i el risc de diabetis és completament independent de l'exposició als cigarrets i és més forta en els no fumadors (Yeh HC. i col., 2005).

La capacitat vital reduïda és un efecte residual comú de les infeccions respiratòries que podrien provocar una resposta inflamatòria. Una habilitat reduïda per detectar i eradicar patògens podria ser la causa de la freqüència elevada d'infeccions del tracte respiratori, de la reducció de la capacitat vital i de la inflamació crònica que acaben en resistència a la insulina i diabetis tipus 2 en alguns individus (Fernández-Real JM. i col., 2008).

Subtils deficiències d'algunes proteïnes del braç sensor del sistema immunitari innat (com el CD14 soluble, l'MBL i la BPI) s'han associat a alteracions del metabolisme de la glucosa. S'ha demostrat que aquestes deficiències corren en paral·lel amb la inflamació i amb deficiències en l'acció de la insulina (Megia A. i col., 2004; i Gubern C. i col., 2006).

Si es tenen en compte els resultats d'aquests estudis que associen aquestes proteïnes del sistema immunitari innat i la sensibilitat a la insulina es pot pensar que l'SP-D podria estar darrera l'associació entre la funció pulmonar i la deficiència de l'acció de la insulina.

Per aquest motiu s'ha prioritzat avaluar l'SP-D d'acord amb els paràmetres de tolerància a la glucosa i la inflamació.

En un estudi recent, per exemple, s'ha volgut relacionar el fenotip de l'SP-D i la base de la síndrome metabòlica. S'ha vist una associació negativa significativa entre la concentració sèrica de SP-D i l'IMC. Es troba una variació de la concentració sèrica de SP-D dependent del sexe, l'edat i el fet de fumar: a més edat, més concentració de SP-D; s'observa una petita correlació negativa entre la concentració de SP-D i l'IMC: quant més IMC menys concentració de SP-D; i la concentració de la proteïna està significativament més elevada en homes (Sorensen GL. i col., 2006). L'anàlisi de multivariàncies indica que els gens que afecten negativament la concentració de SP-D sèrica estan involucrats en la regulació positiva de l'IMC. Però la naturalesa de l'associació i de l'efecte biològic de l'SP-D en relació a l'IMC és desconeguda. També s'observa en aquest estudi que els efectes ambientals són petits i no significatius. En aquest estudi també s'ha observat un paper protector de l'SP-D vers les lesions ateroscleròtiques induïdes per la dieta (Sorensen GL. i col., 2006).

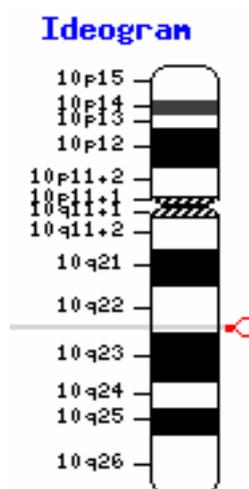
S'observa un augment de la concentració de SP-D en individus fumadors respecte els no fumadors (Sorensen GL. i col., 2006) tot i que un estudi previ indica que l'SP-D broncoalveolar està disminuïda en fumadors (Betsuyaku T. i col., 2004).

En un altre estudi es va comprovar que les concentracions baixes de SP-D faciliten les infeccions pulmonars i un estat inflamatori pulmonar (Leth-Larsen R. i col., 2005).

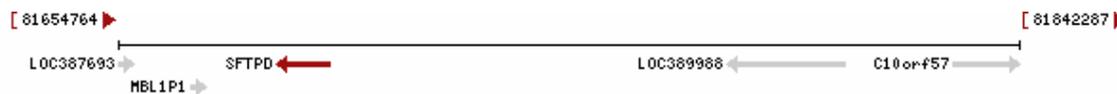
És interessant estudiar la relació de l'SP-D amb la SRI donada la seva funció immunològica i la seva relació amb la inflamació.

### 1.5.6. EL GEN DE L'SP-D (SFTPD)

El gen de l'SP-D es localitza al braç llarg del cromosoma 10: 10q22.2-q23.1 (Figura 1.5.4. i Figura 1.5.5.).



**Figura 1.5.4.** Localització del gen *SFTPD* al cromosoma 10. *NCBI, 2008.*



**Figura 1.5.5.** Localització del gen *SFTPD* dins el cromosoma 10. *NCBI, 2008.*

Un grup d'investigadors va descobrir que aquesta regió del cromosoma 10 codifica per uns tipus de canals de potassi activats per calci (*BK: large conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel*) dels illots pancreàtics. Aquests canals intervenen en la secreció d'insulina. Per tant, aquest locus pot ser d'interès per l'estudi de la DM 2 (Ferrer J. i col., 1996).

L'*SFTPD* té 8 exons, l'últim dels quals codifica pel CRD.

#### **1.5.6.1. Regulació de l'expressió del gen de l'SP-D**

L'expressió de l'ARNm de l'SP-D és induïda durant el desenvolupament del pulmó del fetus amb un increment dels fosfolípids surfactants. L'expressió de SP-D es regula i augmenta molt abans del naixement. En humans, l'ARNm de l'SP-D es pot detectar en les cèl·lules bronquials i en els precursors de les cèl·lules alveolars tipus II cap a la desena setmana de gestació, i les seves concentracions augmenten espectacularment durant el tercer trimestre. La regulació d'aquest desenvolupament sembla estar lligat al factor-3 $\beta$  nuclear d'hepatòcits (HNF-3 $\beta$ ), ja que aquest element regulador precedeix i es superposa en la transcripció del gen de l'SP-D durant la morfogènesi del pulmó.

S'ha demostrat que el promotor de l'SP-D conté cis-elements per AP-1, una regió de consens AP-1, C/EBP, seqüències E-box, dominis NF-IL-6 (seqüència implicada en la modulació de la resposta de fase aguda) i PEA3, GRE (elements de resposta a glucocorticoides) i un *enhancer* pel factor nuclear d'activació de cèl·lules T (NFAT) i per HNF-3, llocs d'unió per TTF-1 i una GT box (Rust K. i col., 1996).

Els factors de transcripció tipus AP-1 han estat implicats en la regulació del promotor del gen humà de l'SP-D (*SFTPD*). JunB i JunD promouen la transcripció del gen *SFTPD* i c-Jun i c-Fos la inhibeixen. Les mutacions en els llocs d'unió de factors de transcripció com FoxA1 i FoxA2 fan disminuir la transcripció de *SFTPD*. Per altra

banda, la TTF-1 no activa l'expressió de *SFTPD* en cèl·lules H441 *in vitro* (Davé V. i col., 2004).

Els glucocorticoides augmenten l'activitat del promotor del *SFTPD* i acceleren la maduració del pulmó en estudis *in utero*. I les C/EBP- $\alpha$ , - $\beta$  i - $\delta$  fan augmentar la transcripció del gen humà *SFTPD* (en estudis *in vitro* amb cèl·lules H441) (Davé V. i col., 2004).

El tractament de cultius d'explants amb dexametasona fa augmentar l'ARNm i la secreció de SP-D (Dulkerian SJ. i col. 1996), i el tractament amb esteroides materns incrementa la concentració de SP-D en el fetus (Dahl M. i col., 2005).

La IL-4, la IL-13 i el TNF $\alpha$  augmenten l'ARNm de l'SP-D. Això explica que davant una lesió pulmonar augmenti la síntesi de l'SP-D; s'especula que la via de la calcineurina, coneguda per regular l'activació de les cèl·lules T mitjançant la desfosforilació del factor nuclear d'activació de cèl·lules T (NFATs), podria intervenir en la regulació de l'expressió de l'SP-D. Canvis en l'expressió de les citokines i altres molècules immunomoduladores que activen els receptors de les cèl·lules T fan augmentar les concentracions de calci intracel·lular activant la calcineurina. La calcineurina desfosforila el NFAT i la transloca dins el nucli. El NFAT s'agrupa a altres nucleoproteïnes per unir-se als promotors dels gens escollits i induir-ne la transcripció (Davé V. i col., 2004).

Estudis *in vivo* han demostrat un augment de l'ARNm i de proteïna de SP-D en rentats pulmonars de rates després d'una breu exposició a un 95% d'oxigen (Aderibigbe AO. i col., 1999).

### **1.5.6.2. Els polimorfismes del gen *SFTPD* i la seva relació amb la concentració de SP-D**

Fins al 2008 s'han descrit 168 polimorfismes d'un sol nucleòtid del gen *SFTPD*. La majoria d'estudis, però, s'han centrat en 6 polimorfismes concrets. El primer SNP d'interès es localitza a la regió 5'UTR (-759A>G), el segon a l'exó 3 (92A>G) i provoca un canvi d'aminoàcid (Met<sup>11</sup>Thr); un tercer SNP a l'exó 5 (4694C>T), en el qual es canvia una treonina per una alanina al triplet 180. La resta estan localitzats a la regió 3'UTR (11208A>G; 11384A>G; 11466G>A) (Heidinger K. i col., 2004). L'exó 3 i 5 codifiquen per la CLR (regió de col·lagen) que s'encarrega d'activar el sistema immunitari (Kishore U. i col., 2005).

El 92A>G està a la regió N-terminal a la posició 11 (codó o triplet), on una metionina és canviada per una treonina (posició 31 des del lloc d'inici de la transcripció o posició 92 a nivell nucleotídic) que correspondria a un canvi de nucleòtid d'una A per una G respectivament (Met<sup>11</sup>Thr) (dbSNPrs721917). L'al·lel ancestral és la G, la freqüència del qual segons Kathrin Heidinger i col·laboradors és d'un 42.42% (freqüència que s'ajusta a la de la base pública 51.8% per l'adenina i 48.2% per la guanina). Aquest SNP està involucrat en l'oligomerització de l'SP-D (Sorensen GL. i col., 2007).

S'ha observat una relació entre les variacions al·lèliques i els nivells de SP-D en sèrum (Heidinger K. i col., 2004). S'ha comprovat que els individus amb l'al·lel treonina 11 (G) són més susceptibles de patir tuberculosi. I que els individus amb l'al·lel metionina 11 (A) són més susceptibles de patir bronquiolitis a la infantesa causada pel virus respiratori sincicial (RSV) (Heidinger i col., 2004). La variant Thr11 impedeix l'estat oligomèric de l'SP-D i així es redueix la unió de l'SP-D als lligands bacterians (Heidinger K. i col., 2005 i Leth-Larsen R. i col., 2005). De fet, la metionina i la

treonina tenen unes propietats hidrofòbiques molt diferents, i això podria determinar les diferències en l'estructura molecular del pèptid domini N-terminal.

Els individus amb l'al·lel *G* en aquesta posició tenen concentracions més baixes de SP-D en sèrum que els individus homozigots per l'al·lel *A* (Heidinger K. i col., 2004; Leth-Larsen R. i col., 2005). També, en un altre SNP, els individus amb l'al·lel *G* en posició 11208 presenten valors més elevats de concentració de SP-D en sèrum que els individus homozigots per l'al·lel *A*.

La disminució de la concentració de SP-D fa augmentar el risc d'infeccions (Heidinger K. i col., 2004).

Els individus Met/Met<sup>11</sup> (*AA*) mostren dues formes estructuralment diferents de SP-D (SP-D d'alt pes molecular i SP-D de baix pes molecular), mentre que els individus Thr/Thr<sup>11</sup> (*GG*) tenen una forma semblant a la de baix pes molecular dels individus Met/Met<sup>11</sup> (*AA*). La forma de baix pes molecular està predominantment composta de subunitats simples, mentre que la forma SP-D d'alt pes molecular és una mescla de subunitats simples, dodecàmers i multímers.

La unió de l'SP-D als bacteris és dependent de calci i la forma d'alt pes molecular té més afinitat per la unió a bacteris que la forma de baix pes molecular. I, també, la forma d'alt pes molecular té significativament més afinitat pel virus IAV que la forma de baix pes. La forma d'alt pes molecular té més afinitat per unir-se a manoses i la forma de baix pes als lipopolisacàrids (Leth-Larsen R. i col., 2005).

En un altre estudi s'observen tres SNPs que poden tenir relació amb la concentració de la mateixa proteïna en sèrum i que es tractaria d'un haplotip. Els tres SNPs es troben en el codó 11(Met<sup>11</sup>Thr) (SNP citat anteriorment), 160 (Ala<sup>160</sup>Thr), i 270(Ser<sup>270</sup>Thr) del gen de l'SP-D. S'ha observat que variacions al·lèliques conegudes a la regió que codifica per l'SP-D influeixen en l'estructura, la funció i la concentració en sèrum de la

proteïna; són canvis que podrien implicar alteracions en la susceptibilitat a patir infeccions o anomalies en la immunitat.

Es va observar una estreta relació entre Met<sup>11</sup>, Thr<sup>160</sup> i Ser<sup>270</sup> i entre Thr<sup>11</sup>, Ala<sup>160</sup>, i Thr<sup>270</sup> respectivament, en aquest estudi (Leth-Larsen R. i col., 2005).

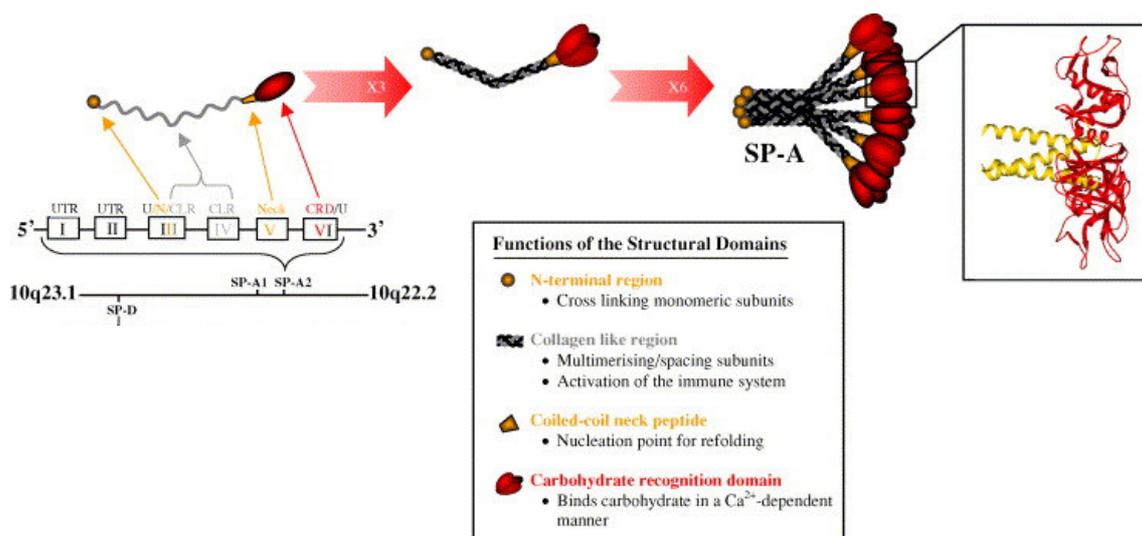
## **1.6. SP-A: PROTEÏNA SURFACTANT A**

### **1.6.1. ESTRUCTURA DE L'SP-A**

L'SP-A és una proteïna gran i hidrofílica. Es troba a unes concentracions 10 vegades superiors a les de l'SP-D.

Aquesta proteïna, com l'SP-D, pertany a la família de les lectines tipus C amb regions de col·lagen: col·lectines (Lu J. i col., 2002; i Holmskov U. i col., 2003) (veure apartat 1.5.1.).

L'SP-A humana presenta dues cadenes: SP-A1 i SP-A2 (Figura 1.6.1.) i és un octodecàmer.



**Figura 1.6.1.:** Estructura proteica i del gen de l'SP-A. SP-A1 o A2 temen 6 exons (4 codificants). L'exó I i II codifiquen per les regions 5' UTR (*untranslated regions*, en negre); l'exó III codifica per la regió 5'UTR, per la regió principal, i per la regió N-terminal que conté cisteïnes (en taronja) i part de la regió tipus col·lagen (gris); l'exó IV codifica la resta de la regió de col·lagen (CLR); l'exó V codifica la regió del coll en espiral d'hèlix- $\alpha$  ( *$\alpha$ -helical coiled-coil neck*) (en taronja); l'exó VI codifica el CRD (vermell) i el 3' UTR (negre). Les cadenes polipeptídiques SP-A1 i SP-A2 plegades entre elles formen hetero- o homotrímers. 6 d'aquestes unitats (homo- o heterotrímers) combinades formen l'SP-A clàssica formada per estructures 18-mèriques. *Kishore U. i col., 2006.*

La proteïna surfactant A té una estructura hexamèrica formada per sis subunitats de 105 kDa cada una, que formen una molècula de 630 kDa (de 18 cadenes). Cada subunitat estructural està composta per tres cadenes polipeptídiques de 35 kDa que estan unides entre elles per ponts disulfur en la posició N-terminal de la cadena. Es considera que cada cadena polipeptídica de SP-A té una cadena SP-A1 i dues cadenes SP-A2. La

forma madura de l'SP-A està composta de 248 aminoàcids (aa) i està formada per: un segment N-terminal (7-9aa, codó [19-27]), una regió tipus col·lagen (73aa, codó [28-100]), una regió coll (en coll d'espiral alfa-helicoidal) (34aa, codó [101-124]) i un domini CRD (de reconeixement de carbohidrats (124aa, codó [125-248]) (Homskov U, 2003; Wang G. i col., 2004) (Figura 1.6.2).

<pre> 1 mwlcpalnl ilmaasgaac evkdvcvgsp gipgtpgshg lpgrdgrdgv kgdpgppgpm 61 gppgetpcpp gnnglpgapg vpgergekge agergppglp ahldeelqat lhdfhrqilq 121 trgalslqgs imtvgekvfs sngqsitfda iqeacaragg riavprnpee neaiasfvkk 181 yntyayvglt egpspgdfry sdgtpvnytn wyrgepagrg keqcvemytd gqwdrncly 241 srlticdf </pre>
--

**Figura 1.6.2.** Seqüència d'aminoàcids de l'SP-A. *NCBI, 2008.*

---

En la regió de tipus col·lagen de l'SP-A, els triplets Gly-X-Y estan interromputs per una torcedura que dóna una forma de ram de tulipes (Figura 1.6.1.) similar a la de la proteïna C1q del complement (Kishore U. i col., 2004).

Alguns estudis destaquen diferències en el producte dels gens de l'SP-A1 i de l'SP-A2 localitzades en les regions tipus col·lagen i CRD, i, per tant, en la seva funció bioquímica (DiAngelo S. i col., 1999). Es destaca la presència d'una cisteïna extra a la posició 85 de l'SP-A1 que es creu que promou la formació de multímers més grans a través dels enllaços disulfur entre trímers. De les tres isoformes de SP-A1 i SP-A2, les predominants tenen un residu de cisteïna a l'N-terminal i les cadenes individuals sense aquest residu es troben només en els multímers més petits (dímers de SP-A2 o trímers de SP-A1). Aquestes diferències estructurals repercuteixen en la funcionalitat de la

proteïna, així, doncs, per exemple la inhibició de la secreció de la fosfatidilcolina exercida per l'SP-A2 i l'SP-A nativa és més gran que l'exercida per l'SP-A1 (Wang G. i col., 2004).

Les unions de l'SP-A als glicolípid, als LPS i a altres molècules de superfície cel·lular són calcidependents.

L'SP-A, igual que l'SP-D, reconeix la maltosa, la glucosa i la manosa, però és específica per la fucosa (Havorum JS. i col., 1993; i Nadesalingam J. i col., 2003).

Una característica important de l'estructura de l'SP-A és el domini Tyr<sup>161</sup>-Asn<sup>162</sup>-Asn<sup>163</sup>-Tyr<sup>164</sup> (Head JF. I col., 2003) que forma una zona hidrofòbica a la superfície (en forma de T) de l'SP-A amb els aa Tyr<sup>192</sup> i Tyr<sup>208</sup>. Aquesta zona pot ser important pel reconeixement del lípid A dels LPS, en combinació amb la zona del CRD (menys polar) (Head JF. i col., 2003).

### **1.6.2. LOCALITZACIÓ DE L'SP-A**

El pulmó és el lloc principal de síntesi de SP-A. La síntesi es localitza a les cèl·lules Clara, als pneumòcits tipus II, a les cèl·lules de les glàndules traqueobronquials i a la capa perifèrica de cèl·lules en forma de calze (Saitoh H. i col., 1998; Madsen I. i col., 2000 i 2003; i Kasper M. i col., 2002). També s'ha detectat SP-A en teixits mesotelials (mesenteri, peritoneu i pleura) (Chailley-Heu B. i col., 1997). De fet, els cossos lamel·lars (grànuls d'emmagatzematge des dels quals es secreta el surfactant alveolar) es troben al pulmó (als pneumòcits tipus II) i també al mesoteli (peritoneu, pleura i pericardi) (Dobbie JW, 1996). Es localitza també la transcripció de l'SP-A i/o SP-D en cèl·lules sinovials, a les trompes d'Eustaquí i sinus, al tracte gastrointestinal, a les glàndules lacrimals, a les glàndules salivals, al pàncrees, al conducte biliar, a les

cèl·lules parietals de l'estómac, a les criptes de Lieberkühn, als túbuls renals, a la pituïtària anterior i al miocardi (Dobbie JW. i col., 1994; Miyamura K. i col., 1994; Rubio S. i col., 1995; Eliakim R. i col., 1997; Madsen J. i col., 2000 i 2003; Paananen R. i col., 2001; van Rozendaal BA. i col., 2001; Stahlman MT. i col., 2002; Leth-Larsen R. i col., 2004; i MacNeill C. i col., 2004).

En general, l'SP-A s'ha considerat una proteïna de superfície associada a secrecions exocrines i a la superfície de mucoses. Però la presència de SP-A en teixits com el múscul i la pell indica que té altres funcions a part de les relacionades amb la immunitat a les mucoses.

S'ha demostrat que les vies respiratòries fetals humanes només expressen l'ARNm de l'SP-A2 (Goss KL. i col., 1998), mentre que a les cèl·lules alveolars tipus II s'expressa tant SP-A1 com SP-A2. L'SP-A2 sola s'expressa en les glàndules submucoses traqueals i bronquials dels conductes respiratoris (Goss KL. I col, 1998; Saitoh H. i col., 1998; i Khubchandani KR. i col., 2001).

### **1.6.3. FUNCIONS DE L'SP-A**

Es creu que l'SP-A és la proteïna del surfactant pulmonar amb un major paper en l'homeòstasi i regeneració del surfactant pulmonar (Pastva AM. i col., 2007).

El lloc de major síntesi de l'SP-A són les cèl·lules alveolars tipus II i les cèl·lules de l'epiteli bronquial no ciliades. L'SP-A es troba en diferents fluids i secrecions biològiques com el sèrum (Doyle IR. i col., 1995), el líquid amniòtic (Miyamura K. i col., 1991; i Cho K. i col., 1999), i en esputs (Masuda T. i col., 1991), tant en estat normal com de patologia. La font principal d'aquesta proteïna, però, són els pulmons (Hermans C i Bernard A, 1999).

### **1.6.3.1. Funcions respiratòries**

L'SP-A intervé en l'homeòstasi surfactant i presenta activitats biofísiques. En aquest sentit inhibeix la secreció de surfactant de les cèl·lules alveolars tipus II. L'SP-A millora l'entrada de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) als pneumòcits tipus II i la seva incorporació dins dels cossos lamel·lars. L'SP-A també fa augmentar l'absorció de fosfolípids a l'interfase aire-líquid i millora la tensió superficial del surfactant *in vitro*. L'SP-A, a més, prevé la secreció de proteïnes causada per l'edema pulmonar proteica. També promou la formació de mielina tubular i altres agregants surfactants (Haagsman HP i van Golde LM, 1991; Wright JR i Dobbs LG, 1991; Weaver TE i Whitsett JA, 1991, Kuroki Y i Akino T, 1991; Childs RA i col, 1992; i Ogasawara Y. i col., 1992). L'SP-A també suprimeix la peroxidació dels lípids del surfactant. Així l'activitat antioxidant de l'SP-A protegeix el pulmó de l'estrès oxidatiu, del col·lapse respiratori, i permet l'intercanvi de gasos (Bridges JP. i col., 2000).

### **1.6.3.2. Funcions immunitàries**

- L'SP-A té propietats antivíriques, antibacterianes, antifúngiques i antial·lèrgiques mitjançant el reconeixement dels dominis de sucres de superfície d'aquestes partícules, l'activació de mecanismes immunitaris per fer-les desaparèixer o la inhibició del seu creixement.
- L'SP-A suprimeix les cèl·lules Th2 i exerceix una *downregulation* de les citoquines Th2. *In vitro* inhibeix la proliferació dels limfòcits T humans i, per tant, provoca una disminució de la producció d'IL-2. L'SP-A prevé la diferenciació de les cèl·lules dendrítiques immadures (Strong P. i col., 2002; i Malherbe DC. i col., 2005). L'SP-A també fa augmentar les concentracions de les citoquines Th1 (Madan T. i col., 2001; Singh M. i col., 2003) i modula

l'expressió de superfície del TLR4 (Schaub B. i col., 2004). L'SP-A millora la fagocitosi macrofàgica i la fagocitosi dels PMNs (Schagat TL. i col., 2001; i Clark H. i col., 2002).

- L'SP-A estimula la secreció de l'antiinflamatori TGF- $\beta$ 1 dels macròfags alveolars (Reid MF i Wright JR, 2002). També afavoreix la inhibició que exerceixen les citoquines en resposta als LPS (Hickling TP. i col., 1998). L'SP-A fa augmentar la producció de TNF $\alpha$  i CSF dels macròfags alveolars (Song M i Phelps DS, 2000). També augmenta la producció de TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 i INF- $\gamma$  dels PBMCs humans (Borron PJ. i col., 1998; Wright JR, 2005). La regió de col·lagen de l'SP-A té funcions de quimiotaxi (Madan T. i col., 1997). I l'SP-A inhibeix la via del complement mitjançant la seva unió a C1p (Watford WT, 2001).
- L'SP-A fa incrementar les concentracions intracel·lulars de Ca<sup>2+</sup> i d'inositol trifosfat (IP<sub>3</sub>) en macròfags alveolars. La resposta al calci es correlaciona amb la generació d'IP<sub>3</sub> que és necessària per tal que es produeixi la fagocitosi mediada per SP-A (Ohmer-Schrock D. i col., 1995).
- L'SP-A inhibeix la producció d'òxid nítric (NO), estimulada pels LPS, dels macròfags alveolars de pulmons normals; però promou la producció de NO en macròfags que han estat activats per l'INF- $\gamma$  (Stamme C. i col., 2000).

A continuació es desenvolupa més àmpliament algunes d'aquestes funcions immunitàries:

**I.Reconeixement de patògens mitjançant SP-A**

L'SP-A és una molècula que reconeix patrons carbohidratats i interactua amb glicoconjugats i lípids de la superfície de microorganismes a través de la seva regió CRD. Normalment l'SP-A reconeix patògens pulmonars amb residus terminals de monosacàrids. Hi ha l'excepció del virus herpes simple (HSV) que sembla ser que s'uneix als oligosacàrids N-ligats de la molècula de l'SP-A (van Iwaarden JF. i col., 1992). L'SP-A s'uneix a residus de mannososa i glucosa, que formen part dels lligands microbians, amb més habilitat que no pas a la galactosa, fructosa i àcid siàlic, que formen part de les glicoproteïnes de les cèl·lules eucariotes (Kishore U i Reid KBM, 2001; i Holmskov U. i col., 2003).

El sistema d'acció de l'SP-A contra els patògens (virus, bacteris i fongs) sol ser mitjançant l'aglutinació, desencadenant fagocitosi i mort mitjançant mecanismes oxidatius, i efectes directes bacteriostàtics i fungistàtics (Wright JR, 2005).

***Ia. Interacció de l'SP-A amb virus***

L'SP-A té propietats antivirals ja que propicia la inactivació i l'agregació viral; desencadena la fagocitosi per part dels macròfags i neutròfils alveolars i propicia l'explosió superoxidativa dels neutròfils (Hartshorn i col., 1996).

La interacció de l'SP-A amb diferents soques del virus Influença A (IAV) apareix dependent de les estructures de l'hemaglutinina expressada en la superfície (HA), de la neuraminidasa i els seus nivells de glicosilació. Quan l'IAV entra als pulmons disminueix l'activació dels neutròfils, i entra a les cèl·lules hoste mitjançant la unió de la molècula trimèrica HA amb els residus d'àcid siàlic de la superfície de les cèl·lules epitelials. La presència de residus d'àcid siàlic a la superfície del CRD de l'SP-A és una altra diana per l'IAV (Benne CA. i col., 1995). Les unions de l'IAV amb l'SP-A causen

l'aglutinació dels virus i, així, s'inhibeix la seva infecció i disseminació, i els macròfags i neutròfils alveolars s'encarreguen de la seva eliminació.

L'SP-A també actua com a una opsonina pel virus respiratori sincitial (RSV). S'uneix a les glicoproteïnes F i G de superfície del virus de forma  $Ca^{2+}$ -dependent. Així, s'inhibeix la seva infectivitat i els virus seran eliminats pels macròfags alveolars i les PBMC (Ghildyal R. i col., 1999). La desaparició del RSV induïda per l'SP-A està significativament relacionada amb la producció de TNF- $\alpha$  per part de les PBMC i reverteix la supressió de la producció de TNF- $\alpha$  produïda pel RSV mitjançant els macròfags U937 (Barr FE. i col., 2000).

L'SP-A també reconeix l'HSV-1 (Gupta G i Surolia A, 2007).

#### ***Ib. Interacció de l'SP-A amb bacteris***

L'SP-A presenta propietats antibacterianes mitjançant els mateixos mecanismes que en virus i perquè propicia la producció d'espècies del nitrogen i dona resistència a les cèl·lules no fagocítiques per tal que no hi entrin bacteris. L'SP-A s'uneix a les estructures carbohidratades de la superfície d'un ampli espectre de bacteris grampositius i gramnegatius a través del seu domini CRD.

L'SP-A s'uneix a *Staphylococcus aureus* (Geertsma MF. i col., 1994), a *Pseudomonas aeruginosa*, a *Escherichia coli* J5 però no a *E. coli* O111 (van Iwaarden JF. i col., 1994), a *Mycobacterium tuberculosis* (Gaynor CD. i col., 1995; Pasula R. i col., 1997), a *Streptococcus pneumoniae*, als grups A i B d'*Streptococci*, a *Hemophilus influenzae* a través de les seves proteïnes de la membrana externa (McNeely TB i Coonrod JD, 1994), a la soca K21a de *Klebsiella pneumoniae* (Kabha K. i col., 1997), i a la preparació bacteriana *Bacillus Calmette Guerin* (Weikert LF. i col., 1997), i provoca diferents nivells d'agregació i fagocitosi mitjançant els macròfags. També s'ha

demonstrat que l'SP-A s'uneix a *S. aureus* i *H. influenzae* tipus b sense causar agregació o fagocitosi (McNeely TB i Coonrod JD, 1994).

S'ha observat que l'SP-A té efectes antibacterians directes que perjudiquen el creixement de bacteris gramnegatius (Wu H. i col., 2003) incloent soques d'*E. coli*, *K. pneumoniae* i *Enterobacter aerogenes*. Un dels efectes és l'augment de la permeabilitat de la membrana bacteriana. Aquesta activitat antibacteriana de l'SP-A es localitza a la seva regió CRD.

També s'ha demostrat que l'SP-A, mitjançant la seva regió CRD, atenua el creixement de *M. pneumoniae* en cultius (Piboonpocanun S. i col., 2005). L'SP-A també reconeix el *Mycoplasma pulmonis* (Gupta G i Surolia A, 2007).

### ***Ic. Interacció de l'SP-A amb llevats i fongs***

L'SP-A té propietats antifúngiques mitjançant els mateixos mecanismes que en virus i bacteris. També retarda el temps de creixement dels fongs; i inhibeix el creixement de les hifes i pseudohifes (Warn i col., no publicat).

L'SP-A suprimeix la producció de citoquines i quimioquines proinflamatòries (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , MIP- $\alpha$  i MCP-1) dels macròfags i monòcits alveolars (Rosseau S. i col., 1997 i 1999). L'SP-A, igual que l'SP-D, contribueix a la formació de clústers de *Pneumocystis carinii*, *in vivo*, mitjançant la interacció amb gpA (glicoproteïna 120), una glicoproteïna rica en mannososa i glucosa expressada en cists i trofozoïts (Zimmerman PE. i col., 1992). L'SP-A també aglutina les formes acapsulades patògenes de *Cryptococcus neoformans* (Schelen ZS. i col., 1995). I l'aglutinació que exerceix l'SP-A sobre els conidis d'*Aspergillus fumigatus*, desencadena la seva fagocitosi i mort mitjançant els macròfags alveolars i els neutròfils circulants (Madan T. i col., 1997a).

L'SP-A exerceix una activitat contra el llevat intracel·lular *Histoplasma capsulatum*, mitjançant l'alteració de la permeabilitat de la seva membrana i que causa la pèrdua de molècules del llevat (McCormack FX. i col., 2003).

L'SP-A també reconeix el *S. cerevisiae* (Gupta G i Surolia A, 2007).

## **II. Paper de l'SP-A en la resistència a la inflamació al·lèrgica i en la hipersensibilitat**

L'SP-A dóna resistència als al·lèrgens i hipersensibilitat pulmonar perquè reconeix el patró de les glicoproteïnes d'agents al·lèrgens (Wang i col., 1996; i Madan i col., 1997).

L'SP-A fa un escombrat d'al·lèrgens, inhibeix la interacció al·lèrgen-IgE i la producció d'histamina, suprimeix l'activació de la sensibilització dels basòfils, dels mastòcits o eosinòfils, suprimeix la proliferació de les cèl·lules B i T; i modula les cèl·lules dendrítiques i els macròfags, i la polarització de les cèl·lules Th (Kishore U. i col., 2002). L'SP-A suprimeix la proliferació dels limfòcits B ja que disminueix les concentracions d'IgG i d'IgE. També, amb la disminució de les concentracions d'IL-2 es pot inhibir la proliferació dels limfòcits B ja que la IL-2 permet el creixement i la diferenciació dels limfòcits. La IL-5 és un factor diferenciador d'eosinòfils i la IL-4 i la IL-13 són factors importants per la diferenciació de les isoformes dels limfòcits B que condueixen a la secreció d'IgG i IgE. Aquestes citoquines marquen la resposta de les cèl·lules Th2 en la reacció al·lèrgica immunitària que es caracteritza per la secreció d'IL-4, IL-5, IL-10 i IL-13 i genera una resposta immunitària humoral (Kishore U. i col., 2005).

L'SP-A s'uneix als àcars de la pols de les cases (*Dermatophagoides pteronyssinus*: Derp.), a les glicoproteïnes d'al·lèrgens, a la gp55 i gp45 d'*A. fumigatus*; inhibeix la unió específica de les glicoproteïnes dels al·lèrgens a la IgE; i bloqueja la producció

d'histamina induïda des dels basòfils potenciada per la presència de *Dermatophagoides pteronyssinus* i *A. fumigatus* (Wang i col., 1996 i 1998; Madan i col., 1997).

S'ha vist que l'SP-A redueix la proliferació de cèl·lules mononucleades de la sang perifèrica (PBMCs) en nens asmàtics sensibles a Derp. (Wang i col., 1998). A més, l'SP-A suprimeix la producció i funció de la IL-8 dels eosinòfils estimulats per ionomicina (Cheng G. i col., 1998).

### **III. Funcions extrapulmonars de l'SP-A**

La presència de l'SP-A en sèrum i en altres teixits extrapulmonars podria indicar un paper important de la proteïna en la immunitat innata fora dels pulmons.

Trobem l'SP-A a l'intestí prim i al colon de rates (Rubio S. i col., 1995); i en la melsa, pròstata i el mesenteri humà (Chailly-Heu B. i col., 1997), i també en els sinoviòcits i l'epiteli lacrimal i salival (Dobbie JW, 1996). També s'ha associat l'SP-A amb partícules secretades tipus surfactant al lumen del colon humà (Eliakim R. i col., 1997).

#### ***IIIa. Funció de l'SP-A a nivell d'aparell genital***

L'SP-A exerceix una protecció contra infeccions i reaccions inflamatòries intrauterines (Kishore U. i col., 2005). Desencadena la fagocitosi contra clamídia a nivell d'òrgans reproductors femenins (Oberley RE. i col., 2004). I en ratolins, l'SP-A indueix el part (Condon JC. i col., 2004).

L'SP-A es pot detectar en el líquid amniòtic a les 26 setmanes de gestació. Es localitza a l'epiteli amniòtic i a la membrana coriònica, i a la capa coriòdecidual de l'úter en l'etapa tardana de l'embaràs (Miyamura i col., 1994). És probable que estigui involucrada en el reconeixement i eliminació de patògens de les membranes fetals i

líquid amniòtic mitjançant les cèl·lules de l'amni i els macròfags de la decídua (Malhotra R. i col., 1994).

L'activitat del part humà està associada a un augment de la producció de prostaglandina  $F_{2\alpha}$  ( $PDF_{2\alpha}$ ) per part dels teixits intrauterins i per un estímul del factor proinflamatori  $TNF-\alpha$  (Norwitz ER. i col., 1992a i b). Com a moduladora de la inflamació, l'SP-A podria suprimir la secreció de  $TNF-\alpha$  per part dels macròfags de la decídua i així es retarda el part induït per la via de les prostaglandines (Kishore U. i col., 2005).

Un estudi ha implicat l'SP-A en l'inici del part en ratolins (Condon JC. i col., 2004). En ratolins, l'augment de l'SP-A en el líquid amniòtic durant la gestació va acompanyada per l'expressió de la  $IL-1\beta$  i l' $NF-kB$  en macròfags intrauterins. A més, l'SP-A té un efecte estimulador directe en l'expressió de la  $IL-1\beta$  i de l' $NF-kB$  dels macròfags del fluid amniòtic al final de la gestació. Tant la  $IL-1\beta$  com l' $NF-kB$  estimulen les vies de síntesi de prostaglandines, i poden provocar el part (Condon JC. i col., 2004).

### ***IIIb. Funció de l'SP-A a les secrecions i líquids biològics***

L'SP-A inhibeix la invasió de *Pseudomonas aeruginosa* a la còrnia (Ni M. i col., 2005). S'ha detectat, també, SP-A en fluids de l'oïda mitja humana (Yamanaka N. i col., 1991). En porcs s'ha detectat l'expressió de SP-A en les trompes d'Eustaqui (Paananen R. i col., 2001). Hi ha, de fet, unes cèl·lules de l'epiteli de les trompes d'Eustaqui que expressen i secreten SP-A. Aquesta SP-A pot ser un bon sistema de protecció independent d'anticòs contra patògens a l'orella mitja (Paananen R. i col., 2001).

#### **1.6.4. MOLÈCULES DE SUPERFÍCIE CEL·LULAR QUE INTERACCCIONEN AMB L'SP-A**

Molts receptors de l'SP-A s'han localitzat a la superfície de les cèl·lules alveolars tipus II i no en macròfags, fet que fa pensar que estan involucrats en l'homeòstasi surfactant (Kuroki Y. i col., 1988; Tino MJ i Wright JR, 1998) (Figura 1.6.3.).

##### **1.6.4.1. El receptor C1q per fagocitosi (C1qRp) o CD93**

El C1qRp o CD93 és una glicoproteïna de 126 kDa que actua de receptor fagocític de l'SP-A (Nepomuceno RR. i col., 1997). El C1qRp és una proteïna de membrana tipus I composta per un CRD tipus C, 5 dominis epidemiològics tipus factor de creixement EGF, un domini transmembrana, i una cua curta citoplasmàtica. El CD93 s'expressa a la superfície de monòcits, macròfags, neutròfils, cèl·lules endotelials i de la micròglia. El C1qRp s'uneix a la regió tipus col·lagen de l'SP-A i desencadena la fagocitosi sense induir la producció de citoquines proinflamatòries (Nepomuceno RR. i col., 1997) (Figura 1.6.3.).

##### **1.6.4.2. La glicoproteïna-340 (gp-340)**

La gp-340 és una opsonina soluble que s'uneix a l'SP-A sense inhibir la capacitat de l'SP-A d'estimular la quimiotaxi dels macròfags. De fet, la gp-340 per si sola estimula la migració aleatòria dels macròfags alveolars (Tino MJ i Wright JR, 1999). La gp-340 s'uneix a l'SP-A per la seva regió CRD.

### **1.6.4.3. CD14**

El CD14 és el receptor principal dels LPS. L'SP-A s'uneix directament a les zones riques en leucina del CD14 (Sano H. i col., 2000). Aquesta unió directa dóna lloc a un mecanisme mitjançant el qual l'SP-A modula la resposta cel·lular desencadenada pels LPS.

L'SP-A s'uneix al CD14 que interacciona amb els TLR regulant l'NF- $\kappa$ B que determina l'expressió de gens en els macròfags alveolars per modificar la inflamació i activar les funcions de la defensa innata dels macròfags alveolars.

### **1.6.4.4. Complex Calreticulín-CD91**

L'SP-A s'uneix de manera calciddependent a la calreticulina (CRT): una proteïna multifuncional de ~60 kDa (Malhotra R. i col., 1990). La calreticulina s'uneix a l'SP-A i a C1q (cC1qR) a través de les seves regions de col·lagen. Alguns estudis han demostrat que el CD91 (o LRP (proteïna relacionada amb el receptor de lípids de baixa densitat) o receptor de la macroglobulina  $\alpha$ 2) actua com a receptor de la CRT (Binder RJ. i col., 2000; i Basu S. i col., 2001). Quan la CRT s'uneix a l'SP-A mitjançant el receptor endocític CD91, la CRT actua com a adaptador molecular per la fagocitosis i la transducció de senyals (Ogden CA. i col., 2001; Vandivier RW. i col., 2002; i Gardai SJ. i col., 2003).

El complex CRT-CD91 també intervé en la inducció de citokines proinflamatòries mediada per l'SP-A (Gardai SJ. i col., 2003) (Figura 1.6.3.).

### **1.6.4.5. SIRP $\alpha$**

L'SP-A s'uneix a SIRP $\alpha$  a través dels seu domini lectina als macròfags i cèl·lules de superfície. A través d'aquesta unió s'activa la fosfotirosina fosfatasa SHP-1, i provoca

un bloqueig de la via de senyalització subseqüent través de les quinases de la família Src i de la MAPquinasa p38, i, conseqüentment, es suprimeix la producció de citokines proinflamatòries. Però quan hi ha la presència de LPS o cèl·lules apoptòtiques, l'SP-A s'uneix a aquests lligands via el CRD agregant-los mitjançant la regió col·lagen. Aquests enllaços en la regió col·lagen poden interactuar amb el complex CRT-CD91 dels macròfags i induir fagocitosi, producció de citokines proinflamatòries i desencadenar la resposta del sistema immunitari adaptatiu (Gardai SJ. i col., 2003).

Així, aquest paper dual de l'SP-A és important per mantenir l'homeòstasi en els pulmons mitjançant la supressió de la inflamació i mitjançant la inducció de la inflamació quan activa l'eliminació de patògens, al·lergògens, cèl·lules apoptòtiques i necròtiques (Figura 1.6.3.).

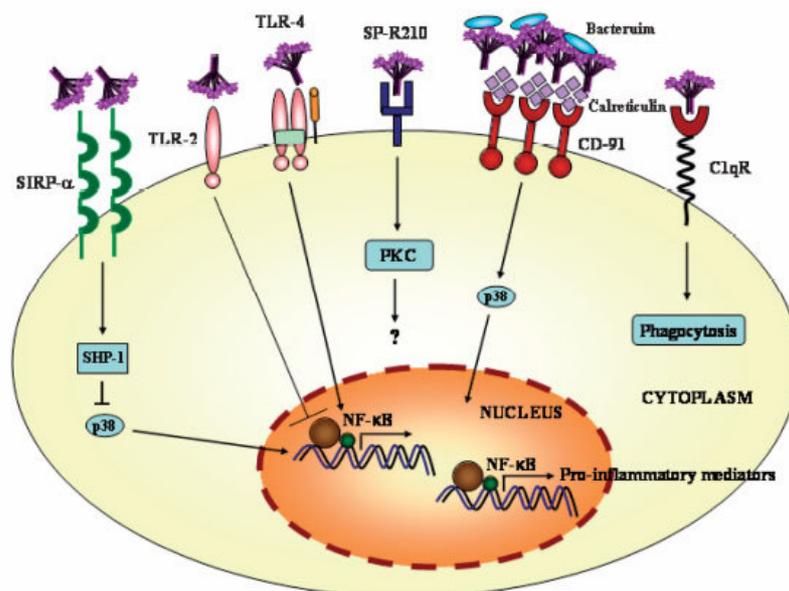
#### **1.6.4.6. TLR2**

Els TLR regulen l'homeòstasi mitjançant la interacció amb lligands proteics endògens i protegeixen l'hoste de les invasions de microorganismes i estimulen la resposta de la immunitat adaptativa (Hoffmann JA. i col., 199). Recentment s'ha descobert que l'SP-A s'uneix al TLR2 i inhibeix les interaccions del TLR2 i els seus lligands com els peptidoglicans i el zimosan. L'activació de l'NF- $\kappa$ B i l'expressió del TNF $\alpha$  induïdes per peptidoglicans o zimosan són significativament inhibides per l'SP-A en els macròfags alveolars (Sano H. i col., 2006). L'SP-A necessita un complex supratrimèric TLR4-MD2 funcional per induir l'activació dels leucòcits (Guillot L. i col., 2002; Yamada C. i col., 2006) (Figura 1.6.3.). L'MD-2 és una proteïna accessòria essencial per desencadenar la senyal mediada pel TLR4. L'MD-2 s'uneix al sTLR4 però no al sTLR2 (Hyakushima N. i col., 2004).

La unió de SP-A al TLR2 és calcidependent i la unió s'esdevé a través del domini CRD de l'SP-A (Murakami S. i col., 2002).

#### **1.6.4.7. SP-R210**

La SP-R210 és una proteïna de 210 kDa. Es tracta d'una forma de miosina 18a de la superfície cel·lular que actua com a fort receptor de l'SP-A (Yang CH. i col., 2005). La seva interacció es produeix a través de la cua de col·lagen de l'SP-A tot i que la interacció és calcidependent. Aquest receptor s'ha localitzat a les cèl·lules alveolars tipus II i als macròfags alveolars. L'SP-R210 està implicat en la inhibició de la secreció de fosfolípids mediada per SP-A, i també està involucrat en la fagocitosi i mort de *M. tuberculosis*, i en la fagocitosi i activació dels macròfags alveolars. La interacció de l'SP-A amb l'SP-R210 inhibeix la proliferació de les cèl·lules T (Gupta G i Surolia A, 2007). Sembla ser que l'SP-A, a través d'aquest receptor, regula l'entrada de partícules infeccioses dins la cèl·lula a través d'interaccions directes amb el citoesquelet (Weikert LF. i col., 1997) (Figura 1.6.3.).



**Figura 1.6.3.:** Receptors de col·lectines com SP-A (i SP-D). S'han identificat alguns receptors i alguns possibles receptors que s'uneixen a les col·lectines i que permeten les seves accions immunomoduladores. La unió a l'SP-R210, al TLR-2, al TLR-4, al SIRP $\alpha$ , i al calreticulina-CD91 altera la producció dels mediadors de les citoquines inflamatòries. *Gupta G. i Surolia A., 2007.*

### **1.6.5. SP-A I DIABETIS**

Com s'ha comentat anteriorment hi ha diversos estudis que mostren l'existència d'unions potencials entre malaltia pulmonar i intolerància a la glucosa, resistència a la insulina i diabetis tipus 2 (veure apartat 1.5.5.). Per aquest motiu s'ha volgut analitzar l'SP-A d'acord amb els paràmetres de tolerància a la glucosa i inflamació.

Les proteïnes surfactants han estat estudiades en la lesió pulmonar, una situació que s'ha associat al dany en les cèl·lules alveolars tipus II i alteracions en el sistema surfactant. Els pacients amb ARDS (síndrome d'insuficiència respiratòria aguda) o amb risc de desenvolupar ARDS i els pacients amb lesió pulmonar parenquimal traumàtica

presenten concentracions baixes de SP-A en el fluid broncoalveolar (Hermans C i Bernard A, 1999).

Normalment, l'SP-A es troba en baixes concentracions en sang (Robin M. i col., 2002); i Takahashi H. i col., 2006) i quan es troba en sèrum és a causa del seu vessament al torrent sanguini procedent del pulmó. No es coneixen els mecanismes pels quals l'SP-A arriba al torrent sanguini però la seva concentració serà un indicador de l'estat pulmonar. Així, la seva concentració en sang augmenta en inflamació pulmonar o en dany epitelial pulmonar (Doyle IR. i col., 1999; i Lesur O. i col., 1996).

També s'ha volgut analitzar la relació de l'SP-A amb l'obesitat, la resistència a la insulina i la intolerància a la glucosa perquè en altres estudis s'ha descrit una relació entre proteïnes del braç sensor del sistema immunitari innat (CD14 soluble, MBL, BPI) amb alteracions en el metabolisme de la glucosa. Aquestes deficiències van en paral·lel amb la inflamació i amb l'alteració de l'acció de la insulina (Megia A. i col., 2004; i Gubern C. i col., 2006).

Una de les primeres relacions entre SP-A i diabetis les van observar al 1988 l'equip de Snyder JM. En aquest estudi es va veure que les concentracions de SP-A en el fluid amniòtic eren baixes en dones diabètiques. És una dada important per infants nascuts de mares diabètiques que precisament tenen una incidència més elevada de patir RDS (Robert MF. i col., 1976).

Alguns fetus invariablement desenvolupen hiperinsulinèmia que, al seu torn, fa disminuir la maduració del pulmó fetal. Aquest fet s'ha confirmat amb un model de rates diabètiques embarassades que presenten una expressió de SP-A significativament més baixa (Miakotina OL. i col., 1998). Justament, la infecció intraamniòtica, que coincideix amb concentracions altes d'IL-1 i en parts prematurs, s'ha associat amb la

disminució de la incidència de RDS en infants prematurs, i aquest fet causa un augment de la maduració del pulmó fetal i la biosíntesi de surfactant (Romero R. i col., 1992). Es podria predir que l'expressió intraamniòtica d'IL-1 fa augmentar la transcripció de SP-A i millora la funció pulmonar en ovelles i conills prematurs (Bry K. i col., 1997; i Bachuroski CJ. i col., 2001).

Miakotina OL. i col·laboradors (1998) creuen que la insulina inhibeix la transcripció de l'ARNm de l'SP-A. De fet, s'han descrit seqüències sensibles a la insulina en diferents gens regulats per la insulina (O'Brien RM i Granner DK, 1991). Justament, als dos gens de l'SP-A s'observen seqüències similars a les seqüències sensibles a la insulina a les regions que flanquegen el 5' d'aquests gens (White RT. i col., 1985; i Katyal SL. i col., 1992).

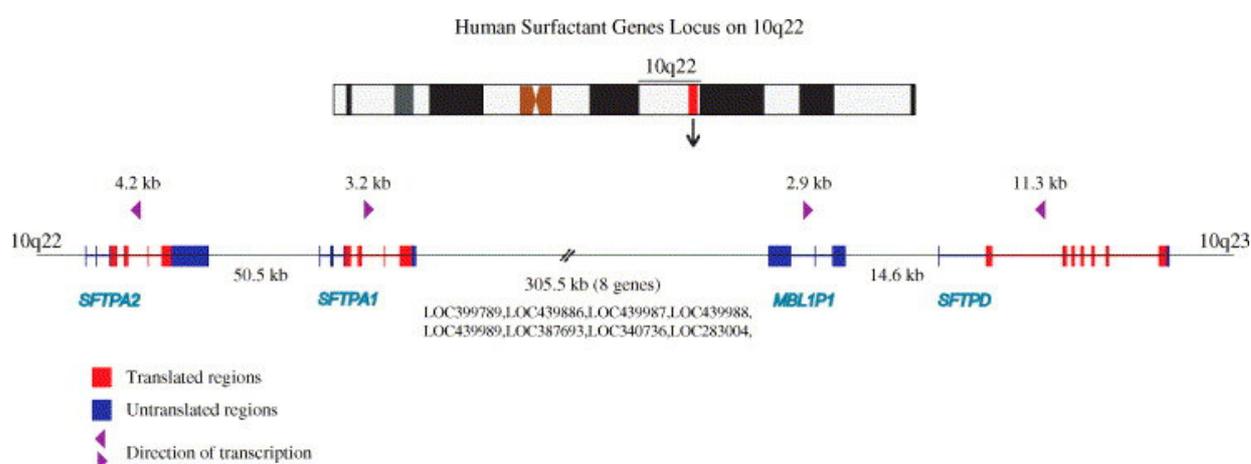
És interessant estudiar la relació de l'SP-A amb la SRI donada la seva funció immunològica i la seva relació amb la inflamació.

#### **1.6.6. EL GEN DE L'SP-A**

Els dos gens transcrits de l'SP-A (*SFTPA1* i *SFTPA2*) i un pseudogen es troben al cromosoma 10: 10q21-24, dins un *cluster* que inclou el gen de l'SP-D i de l' MBL (Figura 1.6.4.).

Diferents estudis han demostrat diferències entre les variants genètiques de l'SP-A1 i l'SP-A2 recombinants humanes i les seves habilitats per estimular la producció de citoquines (Wang G. i col., 2000 i 2002; Huang W. i col., 2004), per unir-se als carbohidrats (Oberley RE i Snyder JM, 2003) i als lípids (Garcia-Verdugo I. i col., 2002).

L'SP-A2 presenta un nivell d'activitat més gran que l'SP-A1 respecte a la seva habilitat de desencadenar inducció de gens inflamatoris i eliminar patògens, possiblement degut a que la proteïna és més estable (Wang G. i col., 2000 i 2002).



**Figura 1.6.4.:** Locus dels gens del surfactant (SP-A i SP-D). Els gens es localitzen al locus 10q22.

*SFTPA1* i *SFTPA2* són adjacents (separats per ~50kb). Els gens *SFTPA1* i *SFTPA2* tenen organitzacions genòmiques similars. *SFTPA1* té 6 exons i *SFTPA2* set exons. L'últim exó del *SFTPA1* i *SFTPA2* codifica per el CRD. Segons el *NCBI Entrez Gene databases* (2008) el pseudogen 1 de la proteïna del surfactant pulmonar A es localitza entre el *SFTPA2* i el *SFTPA1*. Kishore U. i col., 2006.

### **1.6.6.1. Regulació de l'expressió del gen de l'SP-A**

El promotor, el 5' UTR i el 3' UTR del gen de l'SP-A estan involucrats en la regulació de la seva transcripció (Krizkova L. i col., 1994; i Wang G. i col., 2003).

L'expressió de l'ARNm de l'SP-A és induïda durant el desenvolupament fetal del pulmó juntament amb un increment dels fosfolípids surfactants. En humans, l'ARNm de l'SP-A es pot detectar en cèl·lules bronquials i en cèl·lules precursoras de les cèl·lules alveolars tipus II cap a les 20 setmanes de gestació (Khor A. i col., 1993) i la seva concentració augmenta molt durant el tercer trimestre de l'embaràs (Pryhuber GS. i col., 1991). La seva regulació ha estat lligada al factor de transcripció tiroïdal 1 (TTF-1) i al HNF-3 $\beta$  en base a evidències indirectes que indiquen que aquests elements reguladors precedeixen i coincideixen amb la transcripció del gen de l'SP-A (i també el de l'SP-D) durant la morfogènesi del pulmó (Zhou L. i col., 1996; i Stahlman MT. i col., 1998 i 2002).

S'ha observat que anàlegs de l'AMPcíclic i agents que incrementen les concentracions intracel·lulars de l'AMPc (com la prostaglandina E2) fan augmentar tant les concentracions de l'SP-A com de l'ARNm de l'SP-A en el teixit pulmonar fetal (Whitsett JA. I col., 1987). Els glucocorticoides tenen un efecte tant estimulador com inhibitori de la transcripció de l'ARNm de l'SP-A. A baixes concentracions, els glucocorticoides augmenten les concentracions d'ARNm de SP-A durant les setmanes de gestació 15-18, mentre que a elevades concentracions tenen un efecte inhibitori (Boggaram V. i col., 1991). S'ha observat que la regió genòmica -32/+63 bp de l'SP-A1 conté seqüències d'elements de resposta a glucocorticoides (GRE) negatives que semblen ser necessàries pels glucocorticoides per inhibir l'activitat del promotor de l'SP-A (Hoover RR. i col., 1999).

La IL-1 (Seppanen O. i col., 2005) i el factor de creixement epidèrmic també fan augmentar la transcripció de l'SP-A. L'estimulació de l'expressió de l'SP-A que exerceixen la IL-1 i l'AMPc és oxigendependent i mediada a través de l'augment del TTF-1, i també de NF-kB (p65), de l'acetilasa d'histones CBP, i de SRC-1, traduint-se a

una acetilació local de la histona H3 (Islam KN i Mendelson CR, 2006). S'ha demostrat que l'AMPc, mitjançant la fosforilació de TTF-1, desencadena interaccions del TTF-1 amb CBP i SRC-1, que s'hiperacetilaren i s'uniran al promotor de l'SP-A (Yi M. i col., 2002).

L'INF- $\gamma$  augmenta l'expressió de l'ARNm de l'SP-A humana en teixit pulmonar fetal (Ballard PL. i col., 1990) mentre que el TNF $\alpha$  (Wright JR, 1997), l'èster de forbol (Pryhuber GS. i col., 1990) i el TGF- $\beta$  (Whitsett JA. i col., 1987) i la insulina (Snyder JM i Mendelson CR, 1987) la inhibeixen. El TNF $\alpha$  inhibeix l'expressió de l'ARNm de l'SP-A a través de la via de transducció de senyal del p38, mentre que l'èster de forbol inhibeix l'activitat del promotor de l'SP-A mitjançant elements d'ADN d'AP-1 (Miakotina OL i Snyder JM, 2002).

L'activitat del promotor de l'SP-A depèn de molts factors de transcripció com el TTF-1, un element tipus CRE, l'Sp1, l'USF-1, el B-Myb, el GATA6 i el C/EBP (Boggaram V, 2003). Mutacions en l'ADN d'alguns d'aquests elements redueixen l'activitat del promotor de l'SP-A.

L'àcid retinòic i la 1,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub> (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) disminueixen l'ARNm de l'SP-A en cultius de teixit de pulmó fetal i en cultius de cèl·lules alveolars. S'ha demostrat que l'hormona tiroidea (T3) disminueix l'ARNm de l'SP-A en teixit fetal de rata (George TN i Snyder JM, 1997; George TN. i col., 1998; Ramadurai SM. i col., 1998; i Phokela SS. i col., 2005).

La dexametasona inhibeix l'expressió de l'ARNm de l'SP-A (Dulkerian SJ. i col., 1996).



## **1.7. LES DEFENSINES**

Les defensines (també conegudes com a pèptids dels neutròfils humans) són pèptids antimicrobians catiònics, força rics en arginina, amb un pes molecular de 3-6 kDa. Contenen sis residus de cisteïnes que estan units entre si per tres ponts disulfur que són característics d'aquestes proteïnes i que donen estabilitat a una làmina  $\beta$  formada per tres cadenes antiparal·leles (Bauer F. i col., 2001). El número d'aminoàcids d'aquests pèptids pot variar de 20 a 45 (Boman HG, 1995; i Ganz T. i col, 1985). La família de les defensines es divideixen en: defensines  $\alpha$ -,  $\beta$ - (HBD: beta-defensina humana) i  $\theta$ -, i la seva classificació es basa en la posició dels enllaços disulfur (Valore EV. i col., 1998; Tang Y-Q. i col., 1999; i Ethan D. i col., 1997). L'estructura tridimensional de les  $\alpha$ - i  $\beta$ -defensines consisteix en tres làmines  $\beta$  i una hèlix- $\alpha$  (Tang Y. i col. 1999).

Les defensines formen part de la resposta innata davant agents infecciosos. En humans les defensines tenen propietats antibacterianes, antivíriques i antifúngiques (Schneider JJ. i col., 2005). *In vivo* les defensines mostren activitat antimicrobiana més o menys a concentracions de 1-10  $\mu\text{g/ml}$  (Ganz T. i col., 1985). Les defensines protegeixen l'epiteli mitjançant una permanent associació amb els teixits, com en el cas de la pell, els llavis, la llengua i el recte. En altres llocs, com en les vies respiratòries, el tracte gastrointestinal o en el tracte urinari, les defensines són secretades dins el biofilm que cobreix la superfície epitelial i creen una barrera que és químicament letal pels microbis. Les defensines també són quimioquines, és a dir, substàncies que atrauen cèl·lules circulants o migratòries. Així, aquestes proteïnes poden atraure cèl·lules dendrítiques immadures i limfòcits T en llocs danyats o infectats.

Sembla ser que els ponts disulfur d'aquests pèptids no determinen la funció antibacteriana que tenen però sí que són imprescindibles per la seva activitat

quimiotàctica i antivírica (Wu Z. i col., 2003). Aquests ponts disulfur també semblen tenir un paper de protecció davant una possible degradació de les defensines per part de proteïnases (Maemoto A. i col., 2004).

### **1.7.1. LES $\alpha$ -DEFENSINES (HNP: pèptid de neutròfils humans o DEFA: alfadefensines)**

Les  $\alpha$ -defensines estan constituïdes per una cadena de 29 a 35 aminoàcids i són riques en arginina (Lehrer RI i Ganz T, 1992). Contenen tres ponts disulfur en les posicions: 1-6, 2-4 i 3-5 que donen al pèptid una estructura de triple cadena en forma de làmina  $\beta$  amb un bucle en forma de forquilla  $\beta$  ( *$\beta$ -hairpin loop*) que dóna càrregues catióniques a la molècula (De Smet K i Contreras R, 2005).

Les primeres  $\alpha$ -defensines van ser aïllades a partir de neutròfils (Seksted ME. i col., 1985) i constitueixen el 5-7% del total de proteïna dels neutròfils humans (Zimmermann GR. i col., 1995). Des d'aleshores s'han identificat sis  $\alpha$ -defensines. Els pèptids de neutròfils humans 1-4 (de l'HNP-1 al HNP-4) estan localitzats en els grànuls atzuròfils dels neutròfils, on constitueixen el 60% de la proteïna total i contribueixen en el mecanisme oxigenindependent per eliminar les bacteries fagocitades (Sharma S. i col., 2001); i també es troben a les vacuoles fagocítiques d'aquestes cèl·lules (Zimmermann GR. i col., 1995).

L'HNP-1 i l'HNP-3 tenen 30 residus aminoacídics i difereixen només en el primer aminoàcid N-terminal. L'HNP-2 prové de l'HNP-1 i/o HNP-3 ja que coincideixen els seus aminoàcids excepte en els residus aminoterminals (Ganz T. i col, 1998). L'HNP-4 té una seqüència de 35 aminoàcids amb només un 32% d'homologia amb HNP-1-3 (Ihi T. i col., 1997).

Les altres dues  $\alpha$ -defensines, 5 i 6 (HD-5 i HD-6) contenen 45 i 50 aminoàcids, respectivament. Les  $\alpha$ -defensines 5 i 6 es localitzen dins els grànuls de les cèl·lules de Paneth que es troben a la base de les criptes de Lieberkühn dins l'epiteli de l'intestí prim. I seran secretades a aquestes criptes per controlar el creixement bacterià de l'intestí prim (Huttner KM i Bevins CL, 1999). Aquestes dues  $\alpha$ -defensines també es troben a les cèl·lules epitelials del tracte urogenital femení (Ethan D. i col., 1997; i Quayle AJ. i col., 1998). Les HD-5 i HD-6 també s'anomenen defensines entèriques per la seva localització, i estan emmagatzemades com a propèptid dins els grànuls secretors. La tripsina de les cèl·lules de Paneth (Ghost D. i col., 2002; i Salzman NH. i col., 2003) i la metal·loproteïnasa matrilisina (Wilson CL. i col., 1999) són les encarregades de processar el propèptid a defensina funcional. L'HD-5 també s'expressa en molts epitelis de l'aparell reproductor femení com l'epiteli de la vagina, el de l'ectocèrvix, el de l'endocèrvix, el de l'endometri i el del conducte de Fal·lopi (Quayle AJ. i col., 1998). També s'ha detectat HD-5 a la placenta i a les membranes fetals (Quayle AJ. i col., 1998; i Svinarich DM. i col., 1997). A més, s'han observat elevades concentracions de HD5 en secrecions uretrals d'homes amb infecció per *Neisseria gonorrhoeae* i amb uretritis associada a *Chlamydia trachomatis* (Porter E. i col., 2005).

La part C-terminal de les  $\alpha$ -defensines és la responsable de l'activitat antimicrobiana. Les  $\alpha$ -defensines són produïdes com a prepropèptids (de 93-100 aminoàcids) amb un pèptid senyal de 19 aminoàcids i un prosegment aniònic de 41-51 aminoàcids (Huttner KM i Bevins CL, 1999). I són processades a  $\alpha$ -defensines funcionals en 4-24 hores. S'ha comprovat que els animals sense el gen que codifica per les defensines HNP (ratolins *knockout*) són més susceptibles a infeccions intestinals que els que tenen el gen intacte (Wilson CL. i col., 1999).

Els microorganismes fagocitats per neutròfils i que estan dins les vacuoles fagosomals són exposats al contingut dels grànuls dels neutròfils dins dels quals hi ha una gran quantitat de defensines. Els neutròfils també secreten les defensines al medi extracel·lular, i estan a disposició dels macròfags per eliminar les bacteries intracel·lulars (Kisich K. i col., 2002 i; Sharma S. i col., 2000). Encara que el principal objectiu de les HNP-1-3 són els fagolisosomes dels granulòcits i els monòcits, algunes HNP-1-3 són secretades i estan presents a la circulació (De Smet K. i col., 2005; i Selsted ME. i col., 2005) (Taula.1.7.1.).

**Taula 1.7.1.**

**RESUM DE L'ORIGEN, DISTRIBUCIÓ I SÍNTESI DE LES  $\alpha$ -DEFENSINES**

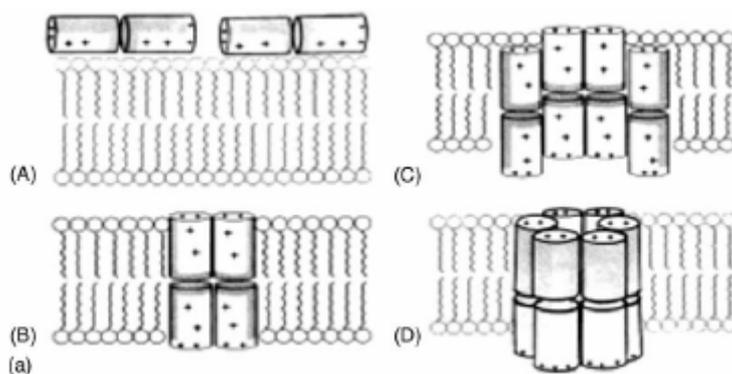
<b>Defensines</b>	<b>Distribució Tissular</b>	<b>Cèl·lules d'on provenen</b>	<b>Síntesi i regulació</b>
<b><i>HNP-1, HNP2 i HNP-3</i></b>	Placenta, mucosa intestinal i mucus cervical	Neutròfils*, monòcits, macròfags, cèl·lules <i>natural killers</i> , cèl·lules B i cèl·lules T $\gamma\delta$	Constitutiva
<b><i>HNP4</i></b>	No s'ha determinat	Neutròfils*	Constitutiva
<b><i>HD5 i HD6</i></b>	Glàndules salivars, intestí prim, intestí gros inflammat, estómac, ulls, tracte genital femení (només HD5), llet materna i lumen uretral inflammat	Cèl·lules intestinals de Paneth*, cèl·lules epitelials de la vagina (només HD5)	Constitutiva o induïble, per exemple, per infeccions de transmissió sexual

\*Cèl·lules principals d'on provenen. HD:  $\alpha$ -defensina humana; HNP: pèptid de neutròfils humans.

## **1.7.2. FUNCIONS DE LES DEFENSINES**

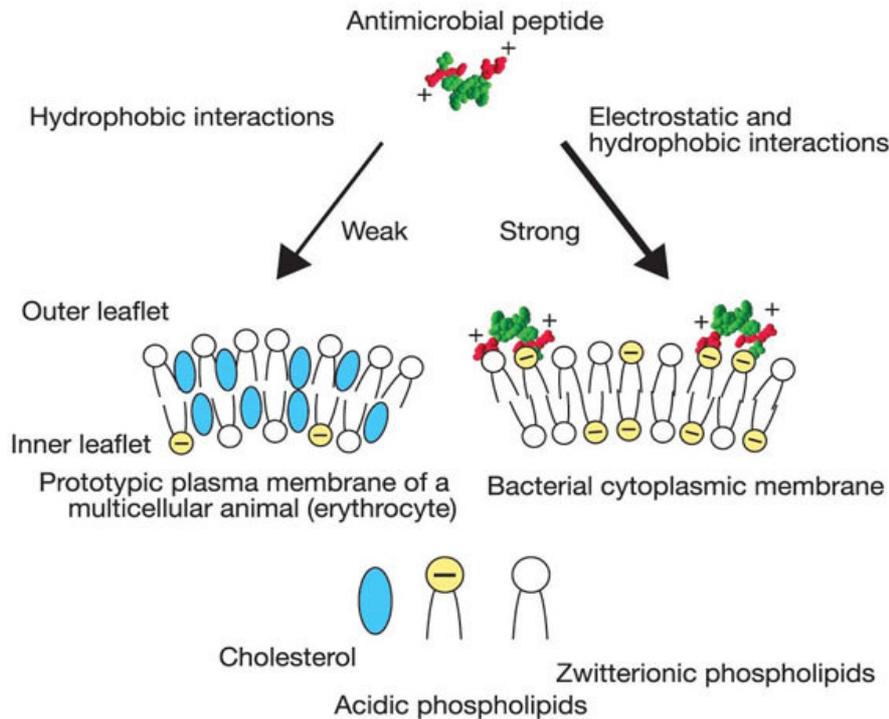
### **1.7.2.1. Funció antibacteriana i antifúngica**

La interacció entre les defensines (que són catióniques) i la membrana d'un microorganisme (que és aniónica) es porta a terme per l'atracció electrostàtica, la qual pot ser inhibida per grans concentracions de sal en la solució on es porti a terme aquesta interacció. Seguidament s'esdevé una permeabilització de la membrana bacteriana. Aquest mecanisme és degut a la incorporació de les defensines i la seva organització en porus (Figura 1.7.1.). Finalment es porta a terme la lisi cel·lular per xoc osmòtic (Ogata K. i col., 1992; i Miyakawa Y. i col., 1996).



**Figura 1.7.1.:** Model de formació de porus mitjançant dímers de defensines. Dímers amfifílics de defensines (les àrees hidrofòbiques estan ombrejades i les àrees catióniques estan indicades amb un +. Les defensines primer s'uneixen als grups aniónics localitzats fora la membrana bacteriana (A), s'insereixen dins la membrana per formar agregats (B i C), i finalment produeixen un grup de sis o més dímers per formar un porus (D). *Chen H. i col., 2006.*

Les defensines exclusivament produeixen dany a la membrana cel·lular bacteriana ja que només tenen afinitat per la membrana degut a que la superfície dels bacteris té elements amb càrrega negativa. Aquests elements carregats negativament són els lipopolisacàrids dels bacteris gramnegatius, els polisacàrids i els àcids teicòics dels bacteris grampositius, i els fosfolípids (fosfatidilglicerol) de dins la membrana dels bacteris gramnegatius i grampositius (Ganz T i Lehrer RI, 1994; Weinberg A. i col., 1998; i Quayle AJ. i col., 1998). Per contra, la membrana externa de les cèl·lules vegetals i animals està composta, principalment, per lípids poc carregats, i els lípids amb abundant càrrega elèctrica només es troben a la cara interna de la membrana (rica en fosfatidilcolina). A més a més, la presència de colesterol a la membrana de les cèl·lules eucariotes dóna estabilitat a la membrana i redueix encara més l'activitat de les defensines sobre aquestes cèl·lules eucariotes (Figura 1.7.2.) (Zasloff M, 2002). No hi ha dades experimentals relacionades amb el mecanisme d'acció d'aquests pèptids sobre organismes eucariotes com els fongs (Schneider JJ. i col., 2005).



**Figura 1.7.2.:** Acció de les defensines sobre la membrana cel·lular bacteriana. *Zasloff M, 2002.*

Les defensines tenen un ampli espectre bactericida contra bacteris grampositius i gramnegatius i també contra virus capsulats i fongs (veure apartat 1.7.2.2.). Les concentracions mínimes inhibidores es troben en un rang de 0.1-100 µg/ml (Starner TD. i col., 2005). L'activitat microbica de les defensines depèn de la permeabilitat de la bicapa aniònica lipídica.

A concentracions de 100 µg/ml, l'HNP-1 i l'HNP-2 maten bacteris gramnegatius i grampositius, tant a nivell intracel·lular com a nivell extracel·lular (Lehrer RI. i col., 1993). No obstant, la seva activitat microbica contra *C. albicans* és baixa comparat amb les α-defensines d'altres espècies (Lehrer RI. i col., 1988). L'HNP-1, l'α-defensina humana més activa, té només el 10% de la potència de l'NP-1 de conill contra *C.*

*albicans* (Müller F-MC. i col., 1999). L'HNP-1 i l'HNP-2, a una concentració de 50 µg/ml, inhibeixen el creixement de *Cryptococcus neoformans* (Ganz T. i col., 1985). L'HNP-1 produïda en macròfags de ratolí inhibeix la replicació d'*Histoplasma capsulatum* dins les cèl·lules (Salzman NH. i col., 2003; i Couto MA. i col., 1994). L'HNP-1 també té activitat bactericida contra *E. coli* (a 10 µg/ml (LD<sub>50</sub>)) i *S. faecalis* (a >10 µg/ml (LD<sub>50</sub>)) (Chen H. i col., 2006).

L'HNP-2 i l'HNP-3, igual que l'HNP-1, tenen activitat microbicida contra virus capsulats, fongs, *E. coli*, *S. faecalis* i el llevat *C. albicans* (Chen H. i col., 2006).

L'HNP-4 té activitat microbicida contra *E. coli* (0.085 µg/ml (LD<sub>50</sub>)), *S. faecalis* (2.35 µg/ml (LD<sub>50</sub>)) i contra *C. albicans* (0.50 µg/ml (LD<sub>50</sub>)) (Chen H. i col., 2006).

Finalment l'HD-5 presenta una activitat microbicida dependent de la seva concentració contra *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* i contra *C. albicans*, amb una concentració mínima inhibidora del rang de nanomolar (Porter EM. i col., 1997).

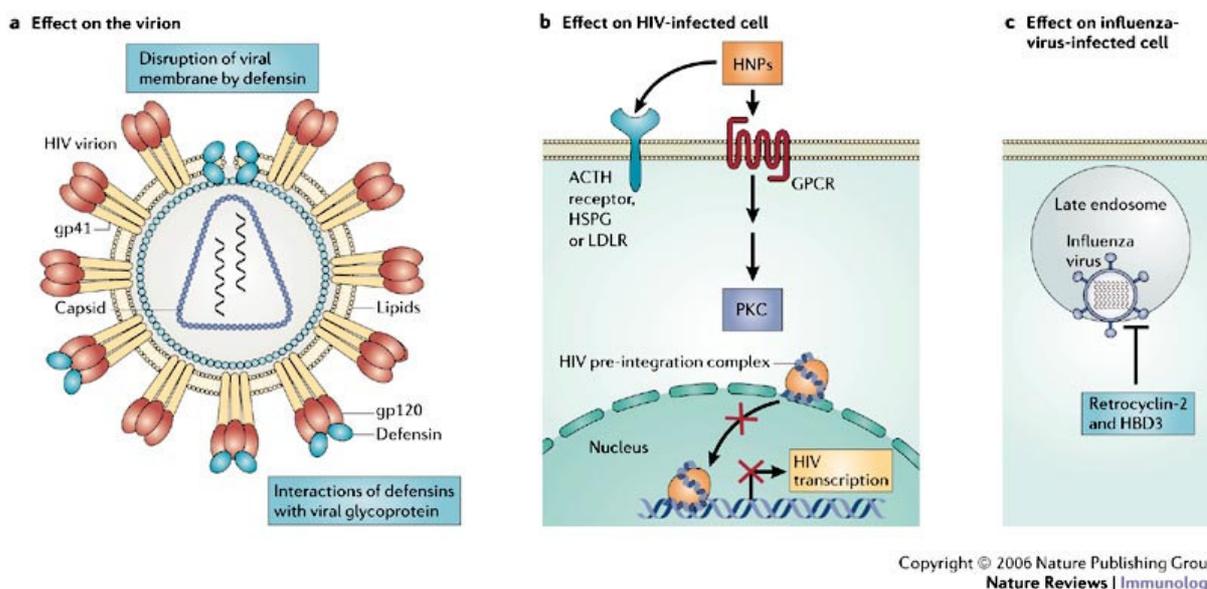
No s'ha determinat, fins ara, el tipus d'activitat microbicida de l'HD-6 (Chen H. i col., 2006).

Les α-defensines s'han detectat a la llet materna. Aquest fet suggereix que aquests pèptids tenen un paper protector dels infants davant les infeccions (Klotman ME i Chang TL, 2006).

### **1.7.2.2. Funció antivírica**

Les defensines tenen un doble paper en l'activitat antivírica. Un aspecte de l'activitat antivírica involucra la interacció directa de les defensines amb la càpsula viral i a través d'un sistema similar a l'antibacterià. L'altre sistema antivíric és indirecte a través de la

interacció de les defensines amb les dianes cel·lulars d'aquests virus. Aquestes interaccions cèl·lula-defensines són complexes i possiblement es porten a terme mitjançant la interacció de les defensines amb les glicoproteïnes de la superfície cel·lular i/o amb la interacció de les defensines amb les vies de senyalització de la cèl·lula que permeten la replicació del virus (Figura 1.7.3).



**Figura 1.7.3.:** Mecanismes de l'activitat antivírica de les defensines. a) En absència de sèrum (com en les superfícies de les mucoses) les defensines inactiven les partícules víriques capsulades mitjançant el trencament de l'embolcall víric o mitjançant la interacció amb les glicoproteïnes víriques, com les gp120 de l'HIV. b) En sèrum, les defensines actuen sobre les dianes cel·lulars mitjançant la interacció amb els GPCR (receptors acoblats a proteïna G) i/o amb la interacció amb altres receptors de superfícies cel·lulars com el receptor d'ACTH (hormona adrenocorticotròpica), l'HSPG (proteoglicà d'heparan sulfat) i el LDLR (receptor de la lipoproteïna de baixa densitat); aquestes interaccions alteren la via de senyalització d'aquests receptors i conseqüentment afecten altres vies de senyalització com la de la proteïna quinasa C (PKC). Aquestes interaccions poden afectar l'activitat viral mitjançant el bloqueig de la importació del virus dins el nucli de la cèl·lula o bé mitjançant el bloqueig de la transcripció de l'ARN víric. c) Les defensines poden bloquejar la fusió de la membrana viral a l'endosoma de la cèl·lula hoste mitjançant la unió de les defensines amb les glicoproteïnes víriques i evitant, així, la replicació vírica. *Klotman ME. i Chang TL., 2006.*

Les alfadefensines HNP1, HNP2 i HNP3 tenen activitat antivírica contra HIV-1, HSV-1, HSV-2, VSV, virus influença, citomegalovirus (CMV), adenovirus i papil·lomavirus. L'HNP1, a més, té efectes antivírics contra l'Echovirus, els reovirus i el virus vaccínic (Klotman ME i Chang TL, 2006).

La defensina HNP1 té efectes contra virus capsulats però no sobre els acapsulats (Daher KA. i col., 1986). Té un fort poder inhibitori sobre el virus herpes símple 1 (HSV-1) i HSV-2, i un efecte directe moderat sobre el virus virus d'estomatitis vesicular (VSV) i sobre el virus influença, i un efecte petit directe sobre el CMV (Daher KA. i col., 1986). La diferència en els efectes inhibitoris de l'HNP1 pot ser a causa de la diferent composició lipídica de la càpsula dels virus. No està clar encara el mecanisme d'inactivació directa dels virus per part de les defensines.

L'HNP1, l'HNP2 i l'HNP3 tenen mecanismes similars per combatre l'HIV. Poden inhibir la replicació de l'HIV mitjançant una interacció directa amb el virus o bé afectant les dianes cel·lulars del virus (Mackewicz CE. i col., 2003; Chang TL. i col., 2005; Chang TL. i col., 2003; i Wang W. i col., 2003). En absència de sèrum, l'HNP1 pot inactivar directament el virus abans que infecti les cèl·lules (Chang TL. i col., 2005). En sèrum i a concentracions baixes (no citotòxiques), l'HNP1 actua a les cèl·lules infectades i bloqueja la infecció d'HIV ja que participa en el procés d'importació del virus al nucli cel·lular o en el procés de transcripció vírica. A més, en les cèl·lules T CD4<sup>+</sup>, l'HNP1 interfereix en la via de senyalització de PKC associada a la importació al nucli de les partícules víriques o associada a la transcripció del seu ARN. Als macròfags, l'HNP1 i l'HNP2 regulen l'expressió de *CC-chemokines* que contribueixen a la inhibició de l'HIV ja que competeixen pels mateixos receptors cel·lulars (Wang W. i col., 2004). Aquestes quimiocines CC també poden induir la producció de les HNP dels neutròfils mitjançant la seva desgranulació (Jan MS. i col., 2006).

L'HNP1, l'HNP2 i l'HNP3 poden funcionar com a lectines ja que s'uneixen a la glicoproteïna gp120 de la càpsula de l'HIV i a CD4, tot i que aquesta unió no se sap com es porta a terme (Wang W. i col., 2004).

L'efecte de l'HNP1 sobre el virus HSV és directe però no és clar. L'activitat anti-HSV de l'HNP1, l'HNP2 i l'HNP3 s'esdevé abans que el virus entri a la cèl·lula, però un cop ha entrat no tenen efectes contra el virus.

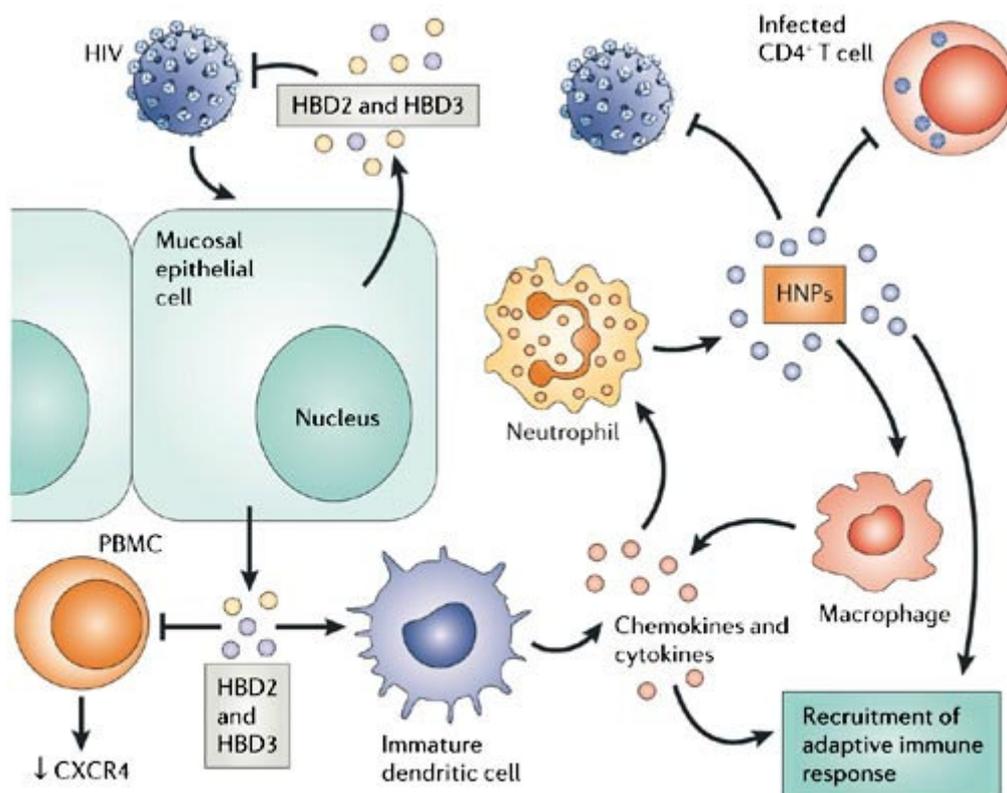
L'HNP4 té efectes antivírics contra HIV-1 i HSV.

L'HD5 té efectes contra el papil·lomavirus. L'HD5 i també l'HNP1 no afecten la unió inicial del virus i la seva endocitosi però eviten que el virus surti dels endosomes (Buck CB. i col., 2006).

### **1.7.2.3. Funció immunoreguladora**

Les defensines atrauen cèl·lules inflamatòries com: els neutròfils, els limfòcits B i els macròfags; i activen aquestes cèl·lules i altres com les cèl·lules epitelials. Totes aquestes cèl·lules alliberen molècules inductores inflamatòries com la IL-8, l'IFN $\gamma$ , la IL-6, la IL-10 i el leucotriè B4 (LTB4) (Territo MC. i col., 1989). Les defensines, també, poden presentar activitat antiinflamatòria per la inducció d'IL-10 o SLPI (inhibidor de proteases de leucòcits de secreció) (Durr M i Peschel A, 2002; i Zasloff M, 2002).

La síntesi de  $\beta$ -defensines per part de les cèl·lules epitelials i l'acumulació de granulòcits de sang perifèrica rics en  $\alpha$ -defensines al lloc de la inflamació genera una alta concentració de defensines. Les defensines, a part de tenir un efecte antimicrobià directe, faciliten i amplifiquen la resposta immunitària subseqüent. Les  $\alpha$ -defensines augmenten la producció de citoquines, l'expressió de molècules d'adhesió (Chaly YV. i col., 2000) i la proliferació limfocitària (Figura 1.7.4.) (Tani K. i col, 2002).



Copyright © 2006 Nature Publishing Group  
Nature Reviews | Immunology

**Figura 1.7.4.:** Paper de les defensines en la immunitat de les mucoses contra la infecció de l'HIV: en el cas de l'HIV, l'epiteli de les mucoses produeixen betadefensines humanes en resposta a la infecció viral. Les HBD tenen un efecte directe sobre els virus d'HIV i indirectament poden afectar la infecció de HIV a través de la regulació de l'expressió de CXCR4 (receptor 4 de quimiocines CXC) per part de les PBMC (cèl·lules mononucleades de la sang perifèrica) en absència de sèrum. Els neutròfils poden produir alfadefensines en resposta a l'estimulació per part de les CC-quimioquines. Les HNP poden inactivar directament els virus de HIV o suprimir la seva replicació mitjançant l'alteració de les seves dianes cel·lulars (o punts cel·lulars de reconeixement del virus). Les HNP i les HBD també poden recloure cèl·lules T, monòcits i DC (cèl·lules dendrítiques) i activar la immunitat adaptativa per controlar la infecció viral. *Klotman ME i Chang TL, 2006.*

Les defensines tenen un poder quimiotàctic sobre les cèl·lules dendrítiques immadures i les poden activar i així es pot iniciar i facilitar la resposta de la immunitat adaptativa.

Tant les  $\alpha$ - com les  $\beta$ -defensines han estat relacionades amb funcions quimiotàctiques per monòcits i cèl·lules dendrítiques immadures.

#### **1.7.2.4. Altres funcions**

Les  $\alpha$ -defensines s'uneixen a les partícules de LDL i afavoreixen la captació de les molècules de LDL per part de l'endoteli, de les cèl·lules de la musculatura llisa i dels fibroblasts, i en regulen la seva posterior degradació (Higazi AA. i col., 2000). Aquestes reaccions poden implicar tant el receptor de LDL com el *LDL-receptor-related protein/ $\alpha$ 2-macroglobulin receptor* ja que s'ha demostrat que les  $\alpha$ -defensines són lligands d'aquestes proteïnes (Higazi AA. i col., 2000; i Nassar T. i col., 2002).

Les  $\alpha$ -defensines s'uneixen *in vitro* a les cèl·lules endotelials (Higazi AA. i col., 1996). Per aquest motiu s'ha proposat que les  $\alpha$ -defensines juguen un paper important en l'arteriosclerosi basat en el fet que es troben acumulades a l'íntima dels vasos arterioscleròtics (Barnathan ES. i col., 1997; i Higazi AA. i col., 1997).

Encara que aquestes observacions suggereixin un possible paper de les  $\alpha$ -defensines en el metabolisme del colesterol i en la funció vascular, encara no s'han trobat evidències d'aquests fets en estudis clínics o *in vivo* previs a aquesta investigació.

Les defensines també tenen activitat antitumoral (Lichtenstein A. i col., 2003) i estimulen la proliferació cel·lular (Murphy CI. i col., 1993), i interfereixen en vies de transducció de senyal (Charp PA. i col., 1988).

#### **1.7.3. DEFENSINES, INFLAMACIÓ I DIABETIS**

Algunes  $\alpha$  i  $\beta$ -defensines poden induir la producció de citokines procedents dels monòcits i de les cèl·lules epitelials (Figura 1.7.4.) (Yang D. i col., 2004).

Les defensines també són induïdes com a resposta al dany tissular i, per tant, es poden considerar com a part de la resposta inflamatòria (Lehrer R i Ganz T, 2002).

Per aquests motius és interessant estudiar la relació de les defensines amb paràmetres de la síndrome metabòlica i la inflamació.

#### **1.7.4. EL GEN DE LES DEFENSINES**

Els gens que codifiquen la majoria de les  $\alpha$ -defensines i les  $\beta$ -defensines estan localitzats al cromosoma 8 entre p22 i p23 (Harder J. i col., 1997; i De Smet K., 2005).

Els gens de les  $\alpha$ -defensines HNP-1 (*DEFA1*), HNP-3 (*DEFA3*) i HNP-4 (*DEFA4*) tenen 3 kb d'allargada i estan formats per dos introns i tres exons. Els tres exons corresponen a la regió 5' (regió no codificant (*untranslated region*)), al pèptid senyal (prodefensina) i al pèptid madur (Linzmeier R. i col., 1993). El gen de l'HNP-2 (*DEFA2*) no s'ha trobat encara. Aquest fet indica que l'HNP-2 probablement és un producte proteolític de l'HNP-1 i l'HNP-3 a causa de la seva gran homologia en la seqüència d'aminoàcids (Ethan D. i col., 1997; i Linzmeier R., 1999). El gen de l'HD-5 (*DEFA5*) (3.7 kb) i de l'HD-6 (*DEFA6*) (3.0 kb) tenen només un intró i dos exons que codifiquen el pèptid senyal de la prodefensina i el pèptid madur (Jones DE i Bevins CL, 1992; i Mallow EB. i col., 1996).

##### **1.7.4.1. Regulació de l'expressió genètica de les defensines**

En general les defensines tenen quatre formes d'expressió: a) específica de granulòcits, donada per la desgranulació de neutròfils; és el cas de les  $\alpha$ -defensines; b) específica de les cèl·lules de Paneth; és el cas de les alfa-defensines 5 i 6; c) en cèl·lules epitelials amb expressió predominant a l'epiteli de la llengua, de la tràquea, del tracte respiratori, de

l'intestí prim, del colon, del ronyó i de la pell, i d) en cèl·lules monocítiques del tipus fagocitari, encara que les defensines d'aquest origen no són específiques d'aquest tipus de cèl·lules (Taula 1.7.1.).

L'expressió de les alfa-defensines HNP-1, HNP-2, HNP-3 i HNP-4 és constitutiva. Malgrat tot, el reconeixement de proteïnes bacterianes, com la proteïna A de la part externa de la membrana de *Klebsiella pneumoniae* per part del TLR2 i el reconeixement del flagel d'*Escherichia coli* per part del TLR5, pot induir la producció de l'HNP-1, l'HNP-2 i l'HNP-3 per part de les cèl·lules T assassines naturals (NK: *natural killers*) CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> (Chalifour A. i col., 2004) (Taula 1.7.1.).

L'expressió de l'HD5 i l'HD6 és constitutiva o induïble, per exemple, per infeccions de transmissió sexual (Klotman ME i Chang TL, 2006).

També existeixen inhibidors de l'expressió de les defensines, com la IL-4 i la IL-13 (Ong PY. i col, 2002).

## **1.8. LA VISFATINA**

### **1.8.1. CLASSIFICACIÓ, ESTRUCTURA I LOCALITZACIÓ DE LA VISFATINA**

La visfatina també s'anomena factor desencadenant de colònies de cèl·lules pre-B (PBEF: *pre-B-cell colony-enhancing factor*), ja que es coneixia prèviament amb aquest nom fins que es va comprovar que es tractava de la mateixa proteïna (Fukuhara A. i col., 2005).

És una adipoquina de 473 aminoàcids, de 52 kDa (Figura 1.8.1). La visfatina té un N-terminal hidrofòbic, dos llocs de N-glicosilació, llocs de fosforilació, i 6 cisteïnes.

La visfatina es descriu també com a una nicotinamida fosforibosiltransferasa (Nampt) que sintetitza mononucleòtid nicotinamida (NMN) a partir de nicotinamida en la via de biosíntesi de NAD<sup>+</sup> en mamífers. Aquesta funció ha permès comparar la proteïna amb altres fosforibosiltransferases de tipus II i determinar-ne una possible estructura tridimensional que encara s'està estudiant (Wang T. i col., 2006).

Les adipocitoquines o adipoquines són proteïnes produïdes principalment pels adipòcits (Arner P, 2006). I la visfatina, com a tal, és produïda i secretada principalment pel teixit adipós visceral (d'aquí que se l'anomeni visfatina: *visceral fat*).

```

1 mnpaaeaefn illatdsykv thykqyppnt skvysyfecr ekktenklr kvkyeetvfy
61 glqyilnkyl kgkvvtkeki qeakdvykeh fqddvfnekg wnyilekydg hlpieikavp
121 egfviprgnv lftventdpe cywltnwiet ilvqswypit vatnsreqkk ilakyllets
181 gnldgleykl hdfgyrgvss qetagitasa hlvnfkgt dt vaglalikky ygtkdpvpgy
241 svpaaehsti tawgkdhekd afehivtqfs svpvsvsds ydiynaceki wgedlrhliv
301 srstqaplii rpdsgnpldt vlkvleilgk kfpvtenskg ykllppylrv iqqdgvdint
361 lqeivegmq kmwsieniaf gsggllqkl trdllncsfk csyvvtnglg invfkdpvad
421 pnkrskkgrl slhrtpagnf vtleeegkdl eeygqdllht vfknkvtkts ysfdeirkna
481 qlnieleaah h

```

***Figura 1.8.1.*** Seqüència d'aminoàcids de la visfatina. *NCBI, 2008.*

La visfatina és una proteïna evolutivament molt conservada i els ratolins sense visfatina (visfatina *-/-*) no són viables (Fukuhara A. i col., 2005). És un factor de creixement suposadament secretat, però inhibicions en les vies de secreció dels adipòcits no semblen afectar-ne la seva secreció. Això podria fer pensar que la proteïna es produeix en la lisi dels adipòcits. A més, tampoc té el pèptid senyal típic de les proteïnes secretades. Però estudis de cèl·lules lisades no mostren un augment de concentracions de visfatina. Principalment s'expressa en medul·la, fetge, múscul i limfòcits B activats i es troba elevada en el fluid broncoalveolar de models animals amb problemes pulmonars aguts i en neutròfils de pacients sèptics (Fukuhara A. i col., 2005). S'ha trobat visfatina tant en el nucli cel·lular com en el citoplasma de les cèl·lules (Hug CH. i Lodisch HF., 2005). El fet de localitzar-la en nucli i citoplasma fa pensar que també té un paper en la regulació del cicle cel·lular.

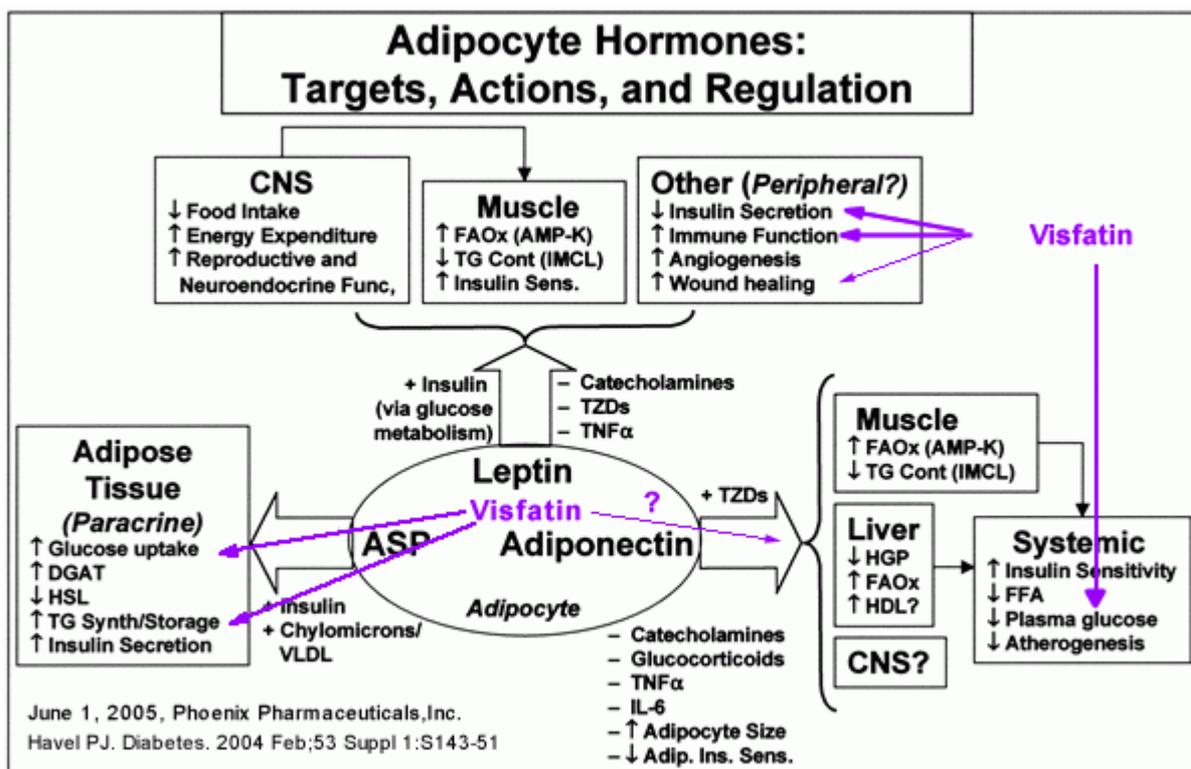
## **1.8.2. FUNCIONS DE LA VISFATINA**

### **1.8.2.1. Funcions metabòliques de la visfatina: acció sobre la glucosa i funció a nivell adipocitari**

Segons resultats d'un estudi del 2005, la visfatina s'uneix i activa el receptor de la insulina, exercint uns efectes mimètics a la insulina tant *in vitro* com *in vivo*, com per exemple disminuir la concentració de glucosa de la sang (Fukuhara A. i col., 2005) (Figura 1.8.2.). Aquest article però va ser retirat per manca de proves de que la visfatina s'unís al receptor de la insulina (Erratum post date, *Science*, 2007)

Si es fa un tractament amb visfatina en cultius cel·lulars, augmenta l'entrada de glucosa als adipòcits 3T3-L1 i als miòcits L6 i es suprimeix la producció de glucosa dels hepatòcits H4IIEC3. És un efecte similar al de la insulina (Jia SH. i col., 2004).

Si s'introdueix visfatina en ratolins (s'insereix als animals un vector adenoviral que porta el gen de la visfatina), s'esdevé una lleugera reducció de les concentracions de glucosa en plasma i una davallada de les concentracions d'insulina. Per tant, es pot concloure que la visfatina fa disminuir la concentració de glucosa en sang (Jia SH. i col., 2004).



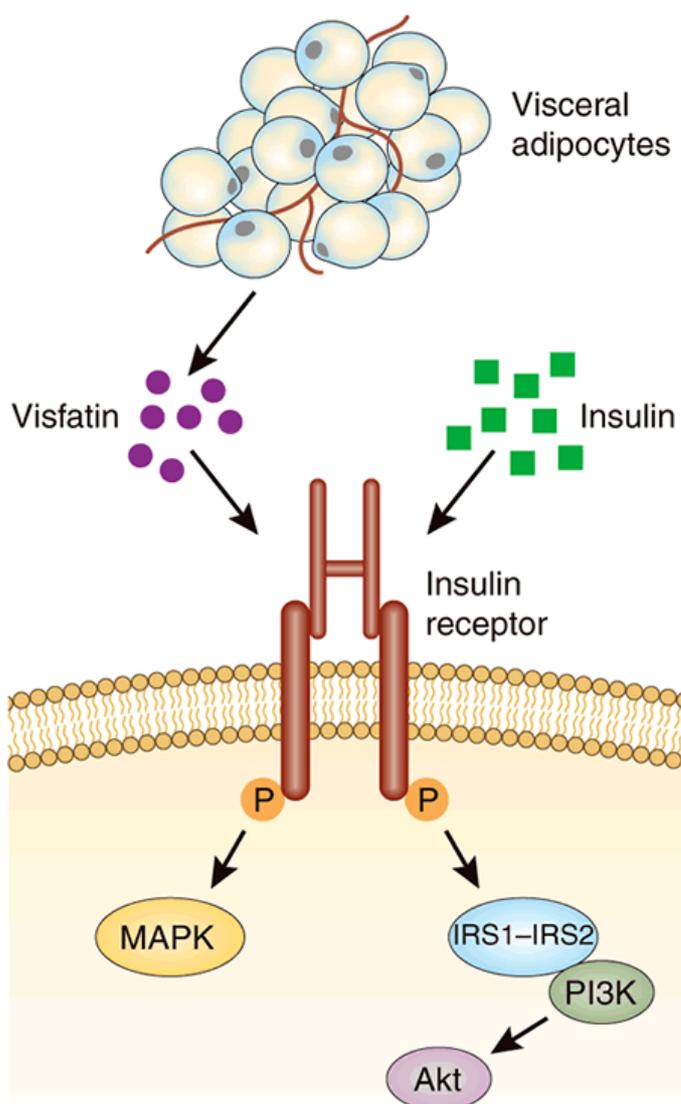
**Figura 1.8.2.:** Esquema de proteïnes sintetitzades pels adipòcits i cadena de reaccions. Havel PJ., 2004.

En l'estudi refusat es va observar que introduint visfatina intravenosament s'indueïa la fosforilació de la tirosina del receptor de la insulina (RI), del substrat-1 del receptor de la insulina (IRS-1), i de l'IRS-2 en el fetge, de manera similar a quan s'injecta insulina (Figura 1.9.). El tractament dels adipòcits 3T3-F442A en cultiu amb visfatina induïx la fosforilació del RI, IRS-1, i IRS-2, la unió de la 3-kinase fosfatidilinositol (PI3K) a IRS-1 i IRS-2, i la fosforilació d'Akt i de la proteïna quinasa activada per mitògens (MAPK); tres fets semblants als efectes de la insulina (Fukuhara A. i col., 2005). Com s'ha dit, aquests resultats són controvertits.

La visfatina també potencia l'activitat de PI3K associada a l'IRS-1 en adipòcits primaris derivats del greix epididimal.

Així, la visfatina, segons aquests autors, indueix la fosforilació de les proteïnes de transducció de senyal que actuen en la via de senyalització del receptor de la insulina (Fukuhara A. i col., 2005) (Figura 1.8.3.).

---



**Figura 1.8.3.:** Receptor de la Insulina. *Murphy KG. i Bloom SR., 2006.*

---

També s'ha estudiat l'efecte de la visfatina sobre la diferenciació d'adipòcits. Es van tractar cultius primaris de preadipòcits procedents de dipòsits de greix mesentèric visceral i subcutani de ratolins control amb solució salina (PBS: tampó fosfat salí) i visfatina o insulina. Es va veure que la visfatina, igual que la insulina, induïa l'acumulació de triglicèrids en els preadipòcits (tant dels cultius mesentèrics viscerals com dels subcutanis) i accelerava la síntesi de triglicèrids a partir de la glucosa (Fukuhara A. i col., 2005).

El tractament amb visfatina també indueix l'expressió de gens que codifiquen per marcadors adipocitaris com el PPAR- $\gamma$ , l' $\alpha$ -proteïna d'unió al cebador CCAAT (C/EBP- $\alpha$ ), la sintasa d'àcids grassos (FAS), el diacilglicerol O-aciltransferasa 1 (DGAT-1), l'*adipose P2* (aP2), i l'adiponectina. S'han observat en la visfatina efectes d'inducció d'adipogènesi en cèl·lules 3T3-L1 i 3T3-F442A (Fukuhara A. i col., 2005). Aquests últims resultats han estat contrastats i acceptats.

#### **1.8.2.2. Funcions de la visfatina a nivell immunològic**

Les propietats biològiques de la visfatina són similars a les d'algunes citoquines, com per exemple l'acció antiapoptòtica i la promotora de la proliferació cel·lular (Fukuhara A. i col., 2005).

S'ha comprovat que la IL-1-beta i els lipopolisacàrids estimulen la producció de visfatina en neutròfils de donants sans (Jia SH. i col., 2004).

Quan hi ha una estimulació de les vies inflamàtores a causa de la presència d'endotoxines, els neutròfils estimulats produeixen visfatina i aquesta inhibeix l'apoptosi dels neutròfils a través del mecanisme mediat per la caspasa 3 i la caspasa 8; la visfatina està implicada en la reducció de l'activitat d'aquestes dues caspases (Giamila Fantuzzi PhD., 2005).

La primera funció descrita de la PBEF/visfatina fou la potenciació de l'efecte de la IL-7 sobre la formació de les colònies de les cèl·lules pre-B (Samal B. i col., 1994). També s'ha observat que la insulina i l'IGFs potencien la formació de les cèl·lules pre-B.

### **Regulació immunològica de la visfatina**

L'expressió de la visfatina està regulada per citoquines que promouen la resistència a la insulina com la IL-1 $\beta$ , el TNF- $\alpha$  i la IL-6 i també per lipopolisacàrids.

Una de les investigacions sobre la proteïna ha demostrat per primera vegada que la IL-6 suprimeix la síntesi de l'ARNm de la visfatina. I que, a més, aquest efecte inhibitori és parcialment realitzat via la proteïna quinasa activada pel mitogen p44/42, però no és reversible mitjançant un pretractament amb troglitazona (una tiazolidinediona) (Kralisch S. i col., 2005). La quinasa P1-3 podria tenir un paper en mantenir uns nivells basals d'expressió de visfatina ja que la inhibició d'aquesta proteïna fa disminuir significativament la concentració d'ARNm de la visfatina. Recentment, en un estudi s'ha comprovat que la IL-6 pot influenciar en la síntesi de visfatina en adipòcits 3T3-L1 *in vitro*. La IL-6 fa disminuir l'ARNm de la visfatina de forma dosiddependent i dependent del temps. Aquest fet suggereix que la *downregulation* portada a terme per la IL-6 sobre la funció mimètica a la insulina que té la visfatina en teixit adipós podria ser un mecanisme mitjançant el qual aquesta adipocitoquina produeix intolerància a la glucosa. Però la IL-6 incrementa amb l'augment del pes corporal; i aquest efecte de la IL-6 sobre la visfatina no intervindria en les cèl·lules adiposes ja que les concentracions de visfatina trobades en l'obesitat són elevades. No obstant, la visfatina no només és expressada en teixit adipós i la seva regulació mitjançant la IL-6 pot ser diferent segons el teixit (Kralisch S. i col., 2005).

### **1.8.2.3. Altres funcions de la visfatina**

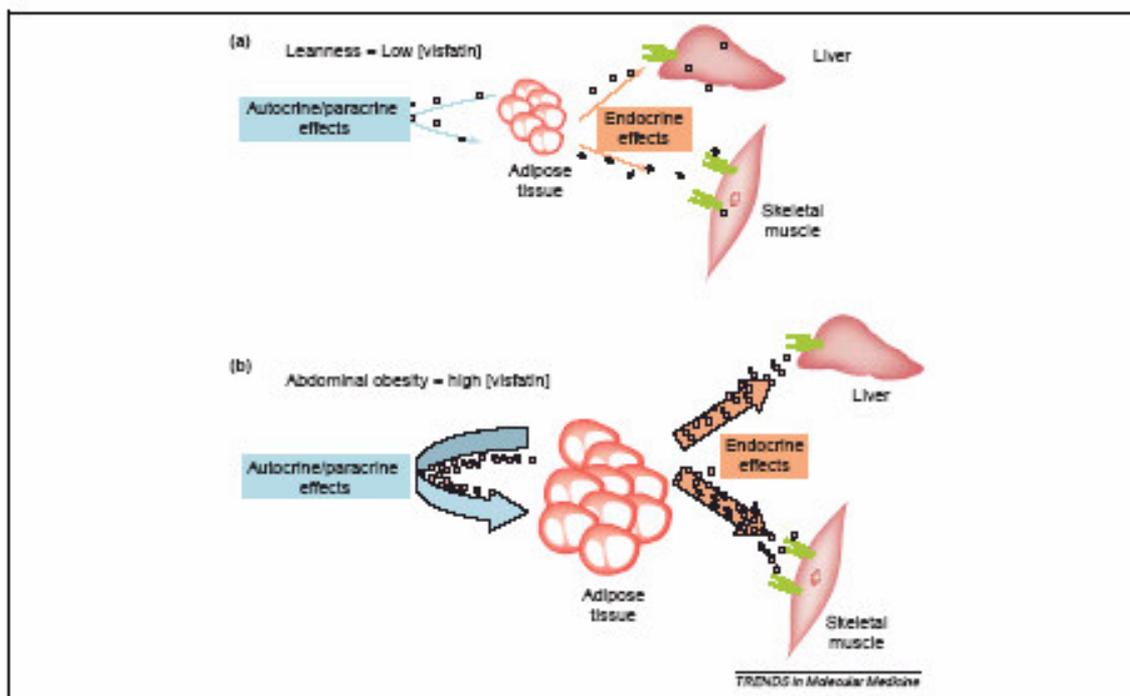
En un estudi es va observar que les cèl·lules de l'epiteli amniòtic humà secreten visfatina i que té un efecte antiapoptòtic sobre les mateixes cèl·lules epitelials de l'amni i sobre els fibroblasts. Podria ser que protegeixi aquestes cèl·lules de l'apoptosi induïda per infeccions, per la distensió crònica o el part. En cèl·lules amniòtiques estimula l'expressió de la IL-6 i la IL-8 (Ognjanovic S. i col., 2005).

També s'ha identificat la visfatina com a proteïna reguladora de les reaccions dependents de NAD<sup>+</sup> en les cèl·lules de la musculatura llisa, que són reaccions que promouen, entre altres processos, l'adquisició del fenotip madur de les cèl·lules de la musculatura llisa (van der Veer E. i col., 2005).

### **1.8.3. VISFATINA, OBESITAT, SÍNDROME METABÒLICA I DIABETIS**

S'ha observat que l'expressió de la visfatina en el teixit adipós visceral i les seves concentracions plasmàtiques augmenten en paral·lel amb l'obesitat (Fukuhara A. i col., 2005). Les concentracions de visfatina es correlacionen amb el greix abdominal però no amb el greix subcutani.

Com que les concentracions plasmàtiques de visfatina augmenten a mesura que incrementa el greix visceral, s'estudia la relació entre la visfatina i la síndrome metabòlica. La visfatina tindria un paper endocrí ja que podria modular la sensibilitat a la insulina en els òrgans perifèrics i també té un efecte paracrí sobre el teixit adipós visceral, com el de facilitar la diferenciació del teixit adipós a través de les accions proadipogèniques i lipogèniques i facilitar la deposició del greix (Figura 1.8.4.) (Fukuhara A. i col., 2005).



**Figura 1.8.4.** Acció de la visfatina. En els individus prims, la producció de visfatina és baixa i la seva acció sobre la sensibilitat a la insulina podria ser insignificant. L'obesitat intraabdominal potencia l'augment de la producció de visfatina, fet que podria incrementar simultàniament l'obesitat i mantenir la sensibilitat a la insulina en els òrgans perifèrics. *Sethi JK. i Vidal-Puig A., 2005.*

Com ja s'ha comentat es posa en dubte la importància de la visfatina respecte als efectes que té (de similitud a la insulina (Jia i col., 2004)) pel fet que es troba a concentracions baixes i perquè està en estudi si interacciona amb el receptor de la insulina (Fukuhara A. i col., 2005). Però el dramàtic augment de les seves concentracions en el teixit adipós visceral de ratolins obesos suggereix que té un paper significatiu en la fisiopatologia de l'obesitat. Cal establir si la producció de visfatina és una resposta compensatòria a la resistència a la insulina d'un teixit concret o si simplement és un marcador de l'acció de les citoquines inflamatòries del teixit específic.

A finals del 2005, es va comprovar que els pacients amb diabetis tipus 2 (en població xinesa) presentaven el doble de concentració de visfatina en plasma comparat amb els

individus sans. Després d'ajustar els resultats per l'IMC i l'índex de cintura-maluc (WHR) es va observar una associació independent entre la visfatina i la DM 2. De fet, l'únic factor completament independent per les concentracions de visfatina en plasma en aquest estudi era l'índex cintura-maluc (Miao-Pei C. i col., 2006).

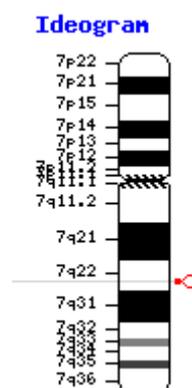
En un altre estudi d'un altre equip d'investigadors no es van trobar correlacions significatives entre les concentracions plasmàtiques de visfatina i els paràmetres de la sensibilitat a la insulina, com la insulina en dejú, les concentracions de glucosa en plasma en dejú, i les concentracions d'infusió de glucosa durant un clamp euglicèmic-hiperinsulinèmic independent del percentatge de greix corporal. Tampoc es van observar diferències de concentració de la proteïna entre sexes; ni una relació entre les concentracions plasmàtiques de visfatina i l'edat o el WHR. Tampoc es van trobar diferències d'expressió de l'ARNm de la visfatina entre el teixit adipós visceral i el subcutani en humans. Aquest estudi però, contradiu les anteriors recerques. En una segona investigació aquest equip va trobar una correlació positiva entre l'expressió de l'ARNm de la visfatina en teixit adipós visceral i les concentracions de visfatina plasmàtica. I sorprenentment s'observà una correlació negativa entre l'expressió de l'ARNm en teixit adipós subcutani i les concentracions plasmàtiques de visfatina. Podria tractar-se d'un mecanisme compensatori. També van observar que els paràmetres de l'obesitat com l'IMC i el percentatge de greix corporal (però no el WHR) estaven significativament correlacionats amb l'expressió del gen de la visfatina a nivell de greix visceral però no de greix subcutani (observat només en dones). Aquest estudi demostrà que les concentracions plasmàtiques de visfatina i l'expressió de l'ARNm de la visfatina a nivell visceral estan correlacionades amb les mesures de l'obesitat però no amb la massa de greix visceral o WHR (Berndt J. i col., 2005).

Pot ser que es tractés de poblacions diferents o de dissenys d'estudis diferents i per això les conclusions finals siguin contradictòries en els dos estudis d'aquest mateix equip (Berndt J. i col., 2005).

Així doncs, no està clar si la visfatina és predominantment un factor correlacionat amb el greix visceral i si està relacionada amb la sensibilitat a la insulina. I la contribució del teixit adipós a la concentració de visfatina circulant és desconeguda, de moment, en humans. Per aquests motius és interessant aprofundir més sobre el tema.

#### **1.8.4. EL GEN DE LA VISFATINA: *PBEF1***

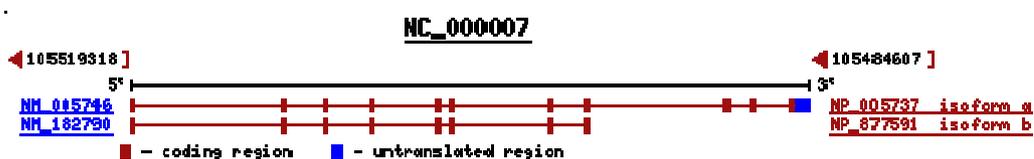
El gen de la visfatina es troba en el cromosoma 7, a la regió q22.3 (Figura 1.8.5. i Figura 1.8.6.) i va ser clonat per Samal B. i col. (1994). Aquest gen inclou 11 exons i té 34.7 kb (Zhang Y-Y. i col., 2006).



**Figura 1.8.5.:** Localització del gen *PBEF1* al cromosoma 7. *NBCI, 2008.*

---

La regió 5' del promotor del *PBEF1* té molts dominis d'unió per famílies de factors de transcripció (Ognjanovic S. i col., 2001) que s'encarreguen de la *up-regulation* de citoquines proinflamatòries, molècules d'adhesió cel·lular i enzims (Moon SK. I col., 2004). Aquests factors de transcripció són: el factor nuclear kappa B (NF-kB) i la proteïna 1 activadora (AP-1). El *PBEF1* també presenta punts d'unió pel receptor  $\alpha$ 1 de l'àcid retinoic (RAR- $\alpha$ 1).



**Figura 1.8.6.**: Estructura del gen de la visfatina. NCBI, 2008.

Es va estudiar i comparar l'expressió del gen de la visfatina i la seva seqüència en rates WOKW (model animal amb síndrome metabòlica) i en rates primes (DA: controls). Les rates WOKW són rates obesas, hiperleptinèmiques, hiperinsulinèmiques, i dislipidèmiques comparades amb les rates DA. Les dues soques són normoglicèmiques. Es va observar que l'expressió del gen de la visfatina en adipòcits no mostra diferències significatives entre els dipòsits de greix de les rates WOKW comparat amb les rates control primes en ambdós sexes. A més, també en ambdós sexes i en les dues soques no es van trobar diferències significatives en els nivells d'expressió del gen entre el teixit adipós blanc visceral i el subcutani (Berndt J. i col., 2005).

Quan es va analitzar la seqüència del gen no es van trobar diferències entre totes les soques estudiades en la regió codificant del gen, i aquesta era idèntica al 100% a la seqüència de GenBank de rates BN/SsNHsdMCW (Berndt J. i col., 2005).

També es va observar que la presència d'un haplotip en el gen de la visfatina, el qual fa disminuir els nivells de transcripció del gen, fa augmentar molt el risc de desenvolupament de complicacions pulmonars en pacients sèptics. Es van genotipar dos SNPs de la visfatina en pacients amb ALI (malaltia pulmonar aguda) associada a sèpsia, pacients amb sèpsia severa i pacients sans i s'observà que els que presentaven l'haplotip GC procedent dels SNPs *T-1001G* i *C-1543T* tenien 7.7 vegades més risc de patir una ALI. Els que presentaven la variant *T* procedent de l'SNP *C-1543T* tenien la transcripció del gen més disminuïda (Ye SQ. i col., 2005).

En un estudi en humans s'ha investigat la relació entre variacions del gen de la visfatina i canvis en l'expressió del gen, i si aquestes variacions poden afectar la fisiopatologia de l'obesitat i/o la DM 2 (Böttcher Y. i col., 2006). Així s'han pogut conèixer set SNPs del *PBEF1*, quatre estan a la regió 5': -1001T>G (rs9770242 de la base de dades de SNPs de la NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), -948G>T, -520G>A i -423A>G (rs1319501); dos estan en introns: c.744 -87G>A (rs4730153) a l'intró 6 i c.1366 -8T>C a l'intró 10; i per últim un SNP que prediu una substitució silenciosa en l'exó 7: c.903G>A TCG>TCA301Ser (rs11553095). El gen de la visfatina també presenta una inserció/deleció al 3'UTR: c.1605 delT. L'SNP rs9770242 està en complet desequilibri de lligament (LD) amb el rs1319501, i l'SNP rs4730153 amb el rs11553095 (Böttcher Y. i col., 2006). En el mateix estudi observen la presència de quatre haplotips: [T-G-A], [T-G-G], [G-G-A] i [G-T-A] procedents dels al·lels dels SNP: rs9770242, -948G>T i rs4730153 respectivament.

En aquest treball no s'han detectat associacions entre aquests SNPs i l'IMC, l'índex cintura-maluc, el percentatge de greix corporal i la glucosa plasmàtica en dejú. No obstant, l'al·lel T de l'SNP -948G>T està significativament associat amb la baixa expressió de l'ARNm de la visfatina i la reducció de les concentracions de la insulina plasmàtica i de la glucosa plasmàtica 2 hores després de la introducció d'un bolus (dosi) de glucosa. Tampoc es veu cap correlació entre els tres SNPs més representatius (rs9770242, rs4730153 i -948G>T) i la concentració d'ARNm de visfatina o visfatina plasmàtica en dejú. Però sí que hi ha correlació entre els tres SNPs i la relació d'expressió d'ARNm de visfatina en teixit adipós visceral respecte l'adipós en general (visceral/adipós) (Böttcher Y. i col., 2006).

Un altre grup de científics, més recentment ha estudiat la correlació d'alguns d'aquests SNPs citats amb paràmetres de la síndrome metabòlica en nens. Però no han vist cap associació entre els SNPs rs9770242, -948G>T i rs4730153 i els seus haplotips amb l'IMC, el WHR, paràmetres de la glucosa i la insulina o amb el metabolisme dels lípids. Malgrat tot, sí que han observat associacions significatives entre la variant -948G amb una elevada tensió arterial en nens obesos. En l'anàlisi d'haplotips han determinat una relació significativa entre l'haplotip [T-G-A] amb l'elevada tensió arterial tant en nens normals com en nens obesos (Körner A. i col., 2007).

Un altre estudi s'ha centrat en altres SNPs, a part del -948C>A, com el rs7789066 i el -2657G>A de la regió que flanqueja el 5' del gen, i els SNPs intrònics rs3801272, rs3801268, rs6947766 i el rs1319313.

A pràcticament tots aquests SNPs no s'observen diferències significatives en la freqüència dels seus al·lells entre els pacients DM 2 i els control analitzats. Pel què fa a l'SNP -948C>A han vist una associació significativa amb la DM 2 amb unes

freqüències de l'al·lel menor de 0.157 en el conjunt dels casos i de 0.119 en els individus control no diabètics. Aquests autors atribueixen l'associació amb la DM 2 principalment a un excés dels homozigots per l'al·lel menor, tot i que també observen un petit augment del risc de DM 2 en els heterozigots per aquest al·lel. L'haplotip GAAACGT amb l'al·lel A en l'SNP -948 ha estat associat a l'elevat risc de DM 2. Dels haplotips amb l'al·lel C en el -948, el GACACGT sembla tenir efectes protectors evidents.

No s'han trobat associacions significatives entre els tres genotips i l'IMC, el WHR, la concentració de glucosa en dejú i la concentració d'insulina. Però, per altra banda, sí que s'han observat associacions significatives amb la concentració de fibrinogen i de proteïna C-reactiva (dos marcadors inflamatoris que prediuen una futura DM 2). Els individus homozigots per AA tenen un 14% més de concentració de fibrinogen en plasma i un 76% més de concentració de proteïna C-reactiva que els homozigots CC (Zhang Y-Y. i col., 2006).

A més, aquest SNP està en desequilibri de lligament amb els SNPs rs9770242 i -1543G>A (del locus de la visfatina) que estan associats amb risc de dany pulmonar agut (Ye SQ. i col., 2005) i que poden influenciar en l'expressió de la visfatina.

Precisament l'equip de Tokunaga A. i col·laboradors (2008) també han estudiat l'SNP -1543G>A (el descriuen com a -1535T>C). Han observat associacions entre el genotip -1535T/T amb baixes concentracions sèriques de triglicèrids i amb elevades concentracions de colesterol HDL en individus japonesos no diabètics. En anàlisis *in vitro* amb adipòcits 3T3-L1 han revelat que l'activitat del promotor dels -1535T i els -1535C és similar, suggerint que l'associació observada podria reflexar que existeix un desequilibri de lligament entre l'SNP -1535T>C i el causant de les variacions del gen de la visfatina.



## **2. HIPÒTESIS I OBJECTIUS**



Aquesta tesi pretén aprofundir en l'estudi de nous factors inflamatoris de la diabetis tipus 2.

Aquest estudi es centra en:

- Determinar la relació entre les concentracions de diverses proteïnes inflamatòries en plasma d'individus amb DM 2 en estudis de cas-control.
- L'estudi de possibles factors genètics implicats en el desenvolupament de la malaltia, com SNPs d'aquestes proteïnes proinflamatòries.
- Estudiar algunes propietats d'aquestes proteïnes *in vitro*.

Les hipòtesis del treball són:

1. S'hipotetitza que la concentració de SP-D i de SP-A estaran associades amb paràmetres de la sensibilitat a la insulina i d'inflamació.
2. S'hipotetitza que la concentració d' $\alpha$ -defensines estarà relacionada amb paràmetres de la sensibilitat a la insulina i d'inflamació.
3. S'hipotetitza que la concentració de visfatina tindrà una associació amb paràmetres de la sensibilitat a la insulina, de la secreció d'insulina i d'inflamació.

Els objectius concrets del treball són:

*En relació a l'SP-D:*

1. Avaluar la relació entre la concentració de l'SP-D i variables de la síndrome metabòlica i inflamació (estudi *in vivo*).

- a. Estudiar la concentració de l'SP-D en individus normotolerants *vs.* intolerants a la glucosa.
  - b. Estudiar la concentració de l'SP-D en individus DM 2 i DM 1.
  - c. Analitzar la relació entre la concentració de SP-D i variables inflamatòries.
  - d. Estudiar l'efecte de fàrmacs antiinflamatoris sobre la concentració de l'SP-D.
2. Estudiar la relació d'un SNP de l'SP-D (Met<sup>11</sup>Thr) amb la concentració de SP-D.
  3. Determinar si algun al·lel de l'SNP Met<sup>11</sup>Thr es correlaciona amb paràmetres de l'obesitat, de la inflamació i de la síndrome metabòlica.
  4. Estudiar *in vitro* l'efecte de la insulina, de la glucosa, de la insulina i la glucosa juntes, sobre l'expressió i secreció de l'SP-D.

*En relació a l'SP-A:*

5. Avaluar la relació entre la concentració de l'SP-A i variables de la síndrome metabòlica i inflamació (estudi *in vivo*).
  - a. Estudiar la concentració de l'SP-A en individus normotolerants *vs.* intolerants a la glucosa en dejú *vs.* intolerants a la glucosa *vs.* DM 2.
  - b. Analitzar la relació entre la concentració de SP-A i variables inflamatòries.

*En relació a les defensines:*

6. Associar les concentracions de defensines amb les concentracions de paràmetres inflamatoris i de la síndrome metabòlica.

7. Relacionar les defensines circulants amb la funció vascular.

*En relació a la visfatina:*

8. Comparar les concentracions de visfatina entre pacients diabètics (tipus 1 i tipus 2) i individus normals.
9. Avaluar la concentració de visfatina en relació als paràmetres de secreció i sensibilitat a la insulina.



### **3. SUBJECTES, MATERIALS I MÈTODES**



### **3.1. SUBJECTES I PROTOCOLS**

#### **3.1.1. SUBJECTES ESTUDIATS**

En aquest treball s'estudien pacients d'origen caucasià d'ambdós sexes, dins dels quals hi ha un grup control (no obesos), un grup d'obesos (no diabètics), un grup de diabètics (majoritàriament amb DM 2).

Els subjectes tenen les edats compreses entre els 25 i els 75 anys. Cap dels participants de l'estudi ha patit processos infecciosos al mes previ de les extraccions realitzades, i no han donat sang ni han patit intervencions en els últims 6 mesos; les dones premenopàusiques s'han estudiat en la fase fol·licular del cicle menstrual (entre el tercer i vuitè dia de la menstruació).

El pes corporal de tots els subjectes ha estat estable com a mínim tres mesos abans de l'estudi.

Tots els pacients han signat el consentiment informat de l'estudi on se'ls informa del tipus d'estudi, de les finalitats i dels riscos o efectes secundaris que poden patir. El protocol experimental ha estat aprovat pel Comitè Ètic de la Fundació Privada Institut d'Investigació Biomèdica de Girona Dr. Josep Trueta.

El grup de controls són pacients que no prenen cap medicament i no tenen cap evidència d'anormalitat metabòlica i són normotensos.

Els individus no diabètics (controls i obesos) participen en un estudi de factors de riscos cardiovasculars a l'Hospital Josep Trueta de Girona. Cap d'aquests subjectes té evidències de problemes metabòlics a part d'obesitat no mòrbida. Els criteris d'exclusió per aquest grup foren: a) índex de massa corporal (IMC)  $\geq 40$  kg/m<sup>2</sup>; b) presència d'alguna malaltia sistèmica o ús de medicació; c) historial d'abús de drogues o alcohol,

definit per una quantitat superior a 80 g d'alcohol al dia o bé per una activitat de la  $\gamma$ -glutamil transferasa dues vegades superior al límit normal; d) i infecció aguda o malaltia inflamatòria.

La diabetis tipus 2 va ser detectada mitjançant un test de tolerància a la glucosa. Els subjectes amb DM 2 han estat definits d'acord amb el criteri de l'Associació Americana de Diabetis i són pacients clínics ambulatoris de l'Hospital Dr. Josep Trueta de Girona. Tots els pacients amb DM 2 han tingut un control glucídic estable en els 6 mesos anteriors a l'estudi. La teràpia farmacològica per aquests pacients inclou insulina (35%), agents orals hipoglicèmics (49%), estatines (fàrmac per fer disminuir els nivells de colesterol) (39%), fibrats (fàrmac per fer disminuir els triglicèrids) (9%), agents per fer disminuir la tensió sanguínia (44%), aspirina (26%) i al·lopurinol (4%). El criteri d'exclusió per aquest grup fou: a) anomalies hepàtiques, renals, neurològiques, endocrines, o altres anomalies sistèmiques; b) evidències clíniques d'hemocromatosi; c) problemes cardiovasculars majors en els 6 mesos anteriors; d) historial d'abús de drogues o alcohol (definit com a >80g/dia en homes i >40g/dia en dones), o activitat de la transaminasa sèrica superior al doble del límit normal; e) elevades concentracions sèriques de creatinina; f) problemes cardiovasculars aguts durant els 6 mesos anteriors; g) malaltia aguda i evidències d'inflamació crònica o malaltia infecciosa; i h) malaltia mental que impedeixi a l'individu entendre la naturalesa, finalitat i possibles conseqüències d'aquest estudi.

Els pacients s'han abstinut de prendre alcohol i cafè 12 hores abans del test de sensibilitat a la insulina. Com a fumador s'ha definit el subjecte que ha consumit com a mínim una cigarreta diària durant als 6 mesos previs a l'estudi. Les disfuncions de tiroides i malalties hepàtiques s'han descartat mitjançant analítiques bioquímiques.

En l'estudi de l'SP-D i l'SP-A han participat 308 i 164 subjectes respectivament. A tots els subjectes se'ls realitzà el test de tolerància a 75g de glucosa oral d'acord amb el *American Diabetes Association Criteria*. Tots els subjectes amb tolerància normal a la glucosa (n=204 en l'estudi de l'SP-D i n=92 en l'estudi de l'SP-A) tenen la glucosa plasmàtica en dejú <7.0 mM i dos hores després de la presa de 75g de glucosa <7.8 mM; la intolerància a la glucosa en dejú (glucosa  $\geq 4.5$  i < 7 mmol/L) es detectà en 11 subjectes en l'estudi de l'SP-A; i la intolerància a la glucosa (concentració de glucosa, dues hores després de la presa d'una dosi oral de glucosa, entre 7.8 i 11.1 mmol/l) es va diagnosticar a 64 individus en l'estudi de l'SP-D i a 37 individus en l'estudi de l'SP-A. Es diagnostica per primera vegada DM 2 (concentració de glucosa dos hores després de la sobrecàrrega oral de glucosa superior a 11.1 mmol/l) a 40 individus dels 308 total en l'estudi de l'SP-D i a 24 individus en l'estudi de l'SP-A, d'acord amb el *American Diabetes Association Criteria*.

En l'estudi d'alfadefensines hi han participat 130 subjectes no diabètics.

En l'estudi de la visfatina s'han inclòs 103 homes no diabètics (no-DM). S'han estudiat, també, 57 pacients amb DM 2, 31 dels quals són homes i 26 són dones. També s'han inclòs a l'estudi un grup de pacients amb diabetis tipus 1 amb molts anys de malaltia [n=24, 11 homes i 13 dones; mitjana de duració de la diabetis, rang: 16 (6-27) anys] amb necessitats diàries d'insulina superiors a 0.7 U/kg. Cap d'aquests pacients té problemes renals i només un pacient presentava retinopatia.

### ***Replicació de l'estudi***

Per corroborar els resultats de la primera part d'aquest treball (l'SP-D), s'ha avaluat una segona població caucasiana procedent del nord d'Espanya (Astúries). Es tracta d'un grup d'individus que participaren en un estudi sobre diabetis i factors de risc

cardiovascular. L'estudi començà entre 1998-1999 quan 1034 individus, d'edats entre 30 i 75 anys, escollits a l'atzar, foren seleccionats per determinar la incidència de diabetis tipus 2 i prediabetis al Principat d'Astúries.

El 2004-2005 set-cents d'aquests subjectes foren cridats per continuar l'estudi. D'aquests pacients s'han obtingut les mesures antropomètriques i els paràmetres metabòlics que es descriuen a continuació. També se'ls ha aplicat el test de tolerància a la glucosa (Valdes S. i col., 2007). En alguns individus presumptament no diabètics (n=625) s'ha determinat el polimorfisme Met<sup>11</sup>Thr del gen de l'SP-D. Els individus dels quals es disposava de plasma se n'ha mesurat la concentració de SP-D circulant (n=333, 137 homes i 196 dones) (veure apartats 3.3.3. i 3.3.4.).

#### ***Estudi dels efectes del salicilat***

Un grup de 28 subjectes voluntaris entre 30 i 65 anys va participar en un estudi clínic a doble cec, aleatori i randomitzat. L'estudi s'efectuà en tres períodes de tractament (cada un de quatre setmanes) corresponents a dos dosis de concentració diferents de trifusal (1 dosi diària de 600 o 900 mg de trifusal oral) i un placebo (prova registrada NCT00162799). Després de cada període de tractament es donaven dues setmanes de descans. Després de cada tractament es van avaluar la sensibilitat a la insulina, la secreció d'insulina i les variables metabòliques i inflamatòries (Fernández-Real JM. i col., 2008).

En l'assaig s'inclouen homes i dones, però aquestes només hi poden participar si són postmenopàusiques o bé si presenten un mètode contraceptiu fiable (per evitar que estiguin embarassades), o bé si es troben a la fase fol·licular del cicle menstrual.

Els criteris d'inclusió són: a) IMC entre 27.5 i 40 kg/m<sup>2</sup>), b) concentració de glucosa en dejú inferior a 5.5 mmol/l, c) dieta equilibrada i exercici físic en els 2 últims mesos. Tots els individus van signar el consentiment informat de l'estudi.

Els criteris d'exclusió foren: a) diabetis tipus 2 segons el criteri de l'*American Diabetes Association*; b) dones embarassades i que alletaven nadons; c) pacients amb deficiència renal definida a través dels valors de creatinina iguals o superiors a 1.5 mg/dl en homes i 1.4 mg/dl en dones; d) pacients afectats per insuficiència cardíaca o respiratòria que podria causar hipòxia o reduir la perfusió perifèrica; e) infecció crònica o aguda; f) malaltia hepàtica, incloent malaltia hepàtica alcohòlica (demostrada per tests de funció hepàtica o d'abús d'alcohol; g) pacients que prenguin fàrmacs que puguin modificar la tolerància a la glucosa; h) participants d'altres assaigs clínics durant els últims 30 dies; i) incapacitat legal per ser participant.

L'estudi clínic es realitzà d'acord amb la Declaració de Hèlsinki (versió revisada al 1989 a Hong Kong) i d'acord amb "Les bones pràctiques clíniques per estudis de productes mèdics en la Comunitat Europea". L'assaig va ser aprovat pel Comitè Ètic local i el Departament de Salut Espanyola (assaig clínic número: NCT00162799).

### **3.1.2. MESURES ANTROPOMÈTRIQUES**

Els subjectes han estat estudiats en estat de dejú. L'IMC es calcula dividint el pes (en quilograms) per l'alçada (en metres) al quadrat. El perímetre de la cintura és mesurada amb una cinta mètrica situada entre l'última costella i la cresta ilíaca. El perímetre dels malucs es mesura agafant per referència la part més ampla de la regió glútia. I el WHR (índex cintura-maluc) és calculat amb les dades anteriors. La pressió sanguínia és mesurada en posició supina en el braç dret després de 10 minuts de descans; s'utilitza

un tensiòmetre estàndard amb la mida apropiada del maneguet i s'enregistren la primera i la cinquena fase. Els valors usats en l'anàlisi són la mitjana de tres lectures agafades en intervals de 5 minuts. La massa de greix (FM), el percentatge de massa de greix (PFM), i la massa lliure de greix es calculen mitjançant impedància bioelèctrica (Holtain BC Analyzer, UK).

### **3.1.3. PROTOCOL DE L'ESTUDI**

La sensibilitat a la insulina ( $S_I$ ), la secreció d'insulina (AIRg) i l'efectivitat de la glucosa ( $S_G$ ) són mesurades mitjançant els tests de tolerància a la glucosa amb obtenció freqüent de mostres venoses (FSIGT o FSIVGTT) en pacients no diabètics i en els pacients diabètics de diagnòstic recent; als individus diabètics amb malaltia de llarga evolució no se'ls pot aplicar aquest tipus de tècnica.

La  $S_I$  és la mesura de l'efecte de la concentració d'insulina per sobre les concentracions basals que provoca la desaparició de la glucosa (o entrada de glucosa als teixits). L'entrada de glucosa als teixits (o desaparició de glucosa o consum de glucosa per part dels teixits) es mesura mitjançant l'efecte dependent de la insulina (que promou la captació de glucosa per part dels teixits) i de la mateixa glucosa (per un efecte de massa, independent de la insulina) sobre aquesta glucosa que entra als teixits (Bergman RN. i col., 1989; i Kahn SE. i col., 1993).

La secreció d'insulina es calcula com a l'àrea d'insulina durant els primers 10 minuts del FSIGT (Fernández-Real JM. i col., 2008).

L'efectivitat de la glucosa quantifica l'acció de la glucosa *per se* sobre la pròpia desaparició de la glucosa a una concentració basal d'insulina.

### **3.1.3.1. Tests**

**FSIGT (*Minimal Model*): test de tolerància a la glucosa amb obtenció freqüent de mostres venoses:** el protocol experimental per estudis de FSIGT comença entre 8:00 i 8:30 AM després d'una nit de dejú. S'introdueix un catèter dins d'una vena antecubital, i el pacient es manté amb una perfusió de sèrum fisiològic. Consisteix en l'obtenció de mostres de sang basal en dejú als temps -20 min, -10 min, i -5 min abans d'introduir un "bolus" intravenós (dosi) al 50% de glucosa (0.3g/kg de pes corporal) al temps 0 i durant un minut. Un cop introduït s'injecta un catèter al pacient per on s'obtidran mostres de sang per mesurar les concentracions de glucosa i insulina. S'extrauran mostres als temps 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 i 19 minuts. Als 20 minuts s'introdueix un "bolus" d'insulina (0.05 U/kg de pes corporal) i s'obtenen mostres als 22, 23, 24, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 100, 120, 140, 160, 180 minuts. S'extrauran mostres addicionals de sang procedents de la vena contralateral antecubital passats els 180 minuts. Els valors de concentració de glucosa i d'insulina són introduïts al programa informàtic MINMOD i analitzats mitjançant un model de *software* desenvolupat pel Dr. Richard Bergman (UCLA) i es tradueixen en valors d'efectivitat de la glucosa ( $S_G$ ), de secreció d'insulina (AIRg) i índex de sensibilitat a la insulina ( $S_I$ ).

**OGTT: test oral de tolerància a la glucosa:** aquest test es realitza d'acord amb les recomanacions del *National Diabetes Data Group*. Després d'estar 12h en dejú, es dona una dosi oral de 75g de glucosa al pacient; i s'obtenen mostres de sang del pacient als minuts 0, 30, 60, 90 i 120 a través d'un catèter procedent de la vena antecubital. D'aquesta sang se'n mesurarà les concentracions de glucosa i insulina sèriques. Per calcular l'àrea de sota la corba de la glucosa i la insulina s'utilitza el mètode trapezoïdal.



## **3.2. MÈTODES ANALÍTICS**

### **3.2.1. RECOLLIDA DE MOSTRES**

Es recullen 8 ml de mostra de sang venosa dins un *vacutainer* estèril amb EDTA (anticoagulant), es centrifuguen a 3500 rpm durant 15 minuts a una temperatura de 3-4°C. Un cop centrifugat se'n separa el plasma i del precipitat (cèl·lules sanguínies) se'n fa extracció d'ADN. L'ADN genòmic s'extreu mitjançant el kit de columnes de QiaAmp (Qiagen, Chatsworth, CA). El plasma obtingut s'utilitza per fer les ELISAs de la proteïna SP-D, visfatina i alfadefensines.

Per obtenir sèrum s'incorpora la sang en un “vacutainer” estèril amb un separador de sèrum de 8 ml. Es centrifuga la mostra a 3500 rpm durant 15 minuts a 4°C. Com que el tub no té incorporat cap anticoagulant el sobrenedant que se n'obté és sèrum. El sèrum s'utilitza per fer les ELISA de SP-D i visfatina.

Aquestes extraccions es fan en dejú.

### **3.2.2. ALTRES ANÀLISIS**

El colesterol total en sèrum es mesura mitjançant la reacció de colesterol esterasa/colesterol oxidasa/peroxidasa. El colesterol HDL s'ha quantificat després de fer-lo precipitar amb polietilenglicol a temperatura ambient. El colesterol LDL s'ha estimat mitjançant la fórmula de Friedewald (Tremblay AJ. i col., 2004). El coeficient de variació intra- i interassaig és inferior al 4%.

Els triglicèrids en sèrum total es mesuren mitjançant la reacció de glicerol fosfat oxidasa i peroxidasa. El coeficient de variació de l'assaig és inferior al 4%.

L'hemoglobina glicada (HbA1c) es mesura mitjançant cromatografia líquida d'alta resolució (Biorad, Munchen, Germany) i un autoanàlitzador Jokoh HS-10. El coeficient de variació intraassaig i interassaig és inferior al 4%.

Les mesures de concentració de glucosa en sèrum es fan per duplicat mitjançant el mètode de la glucosa oxidasa utilitzant el Beckman Glucose Analyzer II (Beckman Instruments, Brea, CA). El coeficient de variació és del 1.9%.

Les concentracions d'insulina en sèrum són mesurades per duplicat mitjançant un assaig immunoradiomètric monoclonal (IRMA, Medgenix Diagnostics, Fleunes, Belgium). El coeficient de variació (CV) intraassaig i interassaig és menor al 7%.

La proteïna C-reactiva sèrica s'ha determinat mitjançant un assaig immunoturbidimètric (Beckman, Fullerton, CA), amb un coeficient de variació intra- i interassaig inferior al 4% i una sensibilitat de 0.02 mg/L.

La creatinina sèrica s'ha mesurat mitjançant mètodes de laboratori rutinaris.

La concentració plasmàtica de TNFR1 i TNFR2 solubles es determina mitjançant un immunoassaig sensible a l'enzim amplificat de fase-sòlida (EASIA) realitzat en plaques (Medgenix, sTNFR1-EASIA i sTNFR2-EASIA<sup>TM</sup>, BioSource Europe, Fleurus, Belgium). El coeficient de variació intrassaig i interassaig són <7% i <9% respectivament. sTNFR1 EASIA no reacciona amb sTNFR2 i el TNF- $\alpha$  no interfereix en l'assaig.

La concentració en sèrum d'IL-6 s'ha mesurat mitjançant un assaig immunomètric seqüencial quimioluminiscent de qualificació d'enzim en fase sòlida (Immulite 2000, DPC DIPESA S.A., Madrid, Spain); la sensibilitat intrassaig del qual és de 0.5 pg/ml. Els coeficients de variació intrassaig i interassaig són del 11.6% i 5.1%, respectivament.

La concentració sèrica de LBP (proteïna d'unió a lipopolisacàrids, veure: Índex: Definicions) es determina amb el kit comercial d'ELISA de LBP humana (HyCult

biotechnology b.v.; PB Uden, The Netherlands). Les mostres sèriques han estat diluïdes fins a 1000 vegades i s'han seguit les instruccions del manual. L'assaig té una sensibilitat de 1ng/ml i el rang de concentració mesurable és de 0.8 a 50 ng/ml. El coeficient de variació intrassaig i interassaig es troba entre 5-10%.

La concentració del pèptid C en dejú s'ha mesurat mitjançant un immunoassaig fluoromètric (EG & G Walloc, Turku, Findland). Aquest assaig presenta un coeficient de variació intra- i interassaig inferiors al 6%.

### *Activitat plasmàtica de la insulina*

L'activitat plasmàtica de la insulina fou mesurada com descriuen Duckworth WC. i col·laboradors (2004) com a modificació de la tècnica portada a terme per Misbin RI. i col·laboradors (1981). S'incuben 150 µl de sèrum amb 750 µl de tampó Tris 100mM, 1% BSA. Després de 30' a 30°C, s'afegeix <sup>125</sup>I insulina (ionitzada a la posició 15B, aproximadament 10,000 cpm) i s'incuba a 37°C durant 30, 60 i 90 minuts. S'afegeix TCA (10%) a la mescla, el qual fa precipitar la insulina intacta. Seguidament es centrifuga a temperatura ambient i es separa el sobrenedant. Les unitats radioactives es mesuren en el sobrenedant i en el precipitat. Com que el TCA només fa precipitar la insulina intacte, la insulina degradada resta únicament en el sobrenedant. Els resultats són expressats com a % de radioactivitat trobada en el sobrenedant en relació a l'activitat total mesurada en el tub.

***Reactivitat vascular arterial braquial***

S'ha determinat la reactivitat vascular de 52 persones que han estat d'acord en participar en aquest estudi.

Per mesurar la reactivitat vascular s'utilitza un aparell amb ultrasò extern d'alta resolució (128XP/10) amb un transductor d'*array* linial de 7.5-MHz (Toshiba SSH-140A, Japan). Aquest aparell mesura els canvis de diàmetre de l'artèria braquial en resposta a l'hiperèmia reactiva (activitat endotelidependent) i a l'administració sublingual de 400µg de trinitrat gliceril (GTN) (activitat endoteliindependent), tal i com descriuen Celermajer DS. i col·laboradors. El diàmetre del lumen de l'artèria es defineix com a la distància entre l'extrem principal de la paret de l'íntima o endoteli més propera al lumen fins a l'altre extrem de paret de l'íntima o endoteli més proper al lumen. Les imatges són enregistrades a un *super-VHS viotape* (Panasonic MD-830AG).

La vasodilatació endotelidependent es provoca mitjançant una hiperèmia isquèmica que s'aconsegueix quan es col·lapsa el flux arterial mitjançant un torniquet col·locat a l'avantbraç amb el qual s'aconsegueix una pressió de 300 mm Hg durant 5 minuts. Seguidament es treu el torniquet i de cop augmenta el flux sanguini pels vasos i augmenta la segregació de vasodilatadors que faran augmentar el diàmetre del lumen arterial. Aquest valor es mesura com a percentatge de canvi d'obertura del diàmetre del vas sanguini després de l'estímul respecte al basal.

La vasodilatació endoteliindependent s'indueix després de l'administració sublingual de 400 µg de GNT (Solinitrina<sup>TM</sup>, Almirall Prodesfarma, Barcelona, España) i s'expressa com a percentatge de canvi entre el diàmetre arterial basal i el diàmetre arterial 3 minuts després de l'estímul. La hiperèmia reactiva es calcula com al percentatge de canvi entre el flux màxim registrat als 15 primers segons després de l'estímul i el flux durant la resta de la prova o exploració.

El primer registre de dades es determina 10 minuts després que el pacient està tranquil en una habitació en posició supina. Després s'aplica el torniquet durant 5 minuts. El segon registre de dades s'aconsegueix durant 90 segons començant al cap de 10 segons després de treure el torniquet. Al cap de 10 minuts més s'obtenen les últimes dades. 2 minuts després d'administrar la GNT i durant 70 segons es prenen dades. El diàmetre arterial es determina en quatre cicles cardíacs diferents per cada condició o estudi, i la mesura sempre és una mitjana de les dades obtingudes.

La reproductibilitat d'aquesta tècnica a l'Hospital Josep Trueta de Girona ha estat prèviament testada (Fernández-Real JM. i col., 2002).

### **3.2.3. MESURA DE LA CONCENTRACIÓ DE SP-D**

Per aquest treball s'ha emprat un kit d'ELISA especial per mesurar les concentracions de SP-D en plasma EDTA o sèrum (segons la mostra) de la casa comercial BioVendor (Human Surfactant Protein D (SP-D) ELISA RD194059100, BioVendor Laboratory Medicine, Inc. Brno, Czech Republic). Aquest tipus d'ELISA és un immunoassaig enzimàtic tipus *sandwich* que utilitza dos anticossos monoclonals per mesurar quantitativament la concentració de la Proteïna Surfactant D en sèrum, plasma, medis de cultiu tissular, fluid broncoalveolar i líquid amniòtic.

En aquest kit els calibradors o estàndards, els controls de qualitat i les mostres s'incuben dins els pous de la placa amb l'anticòs monoclonal anti-SP-D humana. Després d'una nit d'incubació i d'uns rentats, s'afegeix el conjugat HRP i s'incuba dues hores amb l'SP-D capturada. Després de més rentats el conjugat restant es fa reaccionar amb la solució de substrat *H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-tetramethylbenzidine*. La reacció s'atura mitjançant l'adició de la solució d'àcid sulfúric, i del producte de color groc resultant se'n mesura

l'absorbància a 450 nm. Es construeix una corba estàndard mitjançant el traçat dels valors d'absorbància vers les concentracions de SP-D dels estàndards, i les concentracions desconegudes de les mostres es determinen usant aquesta corba patró.

El límit de detecció del kit (definit com a concentracions de SP-D humana donant una absorbància més gran que la mitja de les absorbàncies dels blancs més tres vegades la desviació estàndard del blanc:  $A_{\text{blank}} + 3 \times \text{SDB}_{\text{blank}}$ ) és de 0.5 ng SP-D/ml de mostra.

El rang de concentració mesurable és de 1.56 a 100 ng/ml. El coeficient de variació intraassaig és inferior al 5%, mentre que l'interassaig és inferior al 10%.

### **3.2.4. ANÀLISI DEL POLIMORFISME DE L'SP-D**

#### **3.2.4.1. Sistema d'extracció d'ADN**

Per fer l'extracció d'ADN s'utilitzen 250 µl de sang dels pacients i el kit d'extracció per columnes Qiagen QIAamp<sup>®</sup> DNA Mini Kit (Qiagen, Chatsworth, CA). Consisteix en fer una lisi de les proteïnes amb la Proteïna K que és lliure d'activitat ADNasa i ARNasa. Tot seguit es passa a purificar l'ADN amb quatre passos on l'ADN queda unit a la membrana de la columna amb l'ajuda d'etanol i rentats de l'etanol perquè aquest no interfereixi en els resultats de la PCR. Les condicions de pH i salinitat en el lisat asseguren que les proteïnes i altres contaminants no es retenguin a la membrana QIAamp. Finalment es dilueix l'ADN en aigua destil·lada, se'n mira la concentració i es dilueixen de nou amb aigua destil·lada fins a obtenir-ne una concentració de 10 ng/µl. La concentració i la qualitat de l'ADN es mesura amb un espectrofotòmetre de raig UV. Els àcids nucleics es quantifiquen a una longitud d'ona de 260 nm i està establert que una densitat òptica de 1.0 té una concentració de 50 µg/ml de solució d'ADN en una cel·la (pas de llum) de 10 mm de longitud. Aleshores per saber la concentració d'ADN cal fer el càlcul següent:

$$[\text{ADN}] = 50 \times \text{OD}_{\text{legida}} \times \text{factor de diluci3} \text{ (si la mostra est3 diluïda)}$$

En aquest cas s'aplica una diluci3 1/37, on en un volum total de 600 µl, diluïm 15 µl de DNA en 540 µl d'aigua destil·lada.

La mesura de la qualitat de l'ADN es basa en el fet que l'OD (absorb3ncia) a 260 nm 3s el doble que l'OD a 280 nm si la soluci3 cont3 ADN pur. Si hi ha contaminants, hi ha alguna OD addicional que ens fa disminuir la relaci3 de l'OD entre 260 i 280 nm. Així l'ADN net ha de tenir una OD-260/OD-280 entre 1.8 i 2.0; la desviaci3 d'aquest valor indica pres3ncia d'impureses en la mostra, 3s a dir, contaminaci3. En aquests casos es torna a fer una nova extracci3 d'ADN de la mostra; si torna a donar un mal resultat es prescindeix de la mostra.

#### **3.2.4.2. Amplificaci3 de l'ADN i discriminaci3 al·l3lica**

Per fer-ho s'utilitza la t3cnica de la reacci3 en cadena de la polimerasa a temps real (PCR-RT) i un assaig *TaqMan SNP Genotyping Assays* de la casa comercial *Applied Biosystems*.

Lee LG. i col·laboradors (1993) i Livack KJ. i col·laboradors (1995) van demostrar que l'assaig de la 5' nucleasa permetia detectar a temps real productes específics per aplicacions concretes. L'assaig 5' nucleasa incorpora, a part dels encebadors de la PCR estàndard, una sonda marcada amb dos fluorocroms, un a l'extrem 5' i un altre al 3'. El fluorocrom de l'extrem 5' emet una fluoresc3ncia que 3s absorbida pel de l'extrem 3' degut a l'efecte FRET (transfer3ncia d'energia ressonant fluorescent). Així mentre la sonda est3 intacta, ben hibridada o en soluci3, la fluoresc3ncia 3s nul·la. Durant l'amplificaci3, la hibridaci3 de la sonda a la seva diana permet que sigui degradada gr3cies a l'activitat 5' exonucleasa de la Taq polimerasa, i, per tant, que s'alliberin els fluorocroms de l'efecte FRET i comenci a detectar-se emissi3 de fluoresc3ncia. Aquesta

fluorescència serà proporcional al número de còpies del producte que s'obté mitjançant la PCR. L'activitat 5' exonucleasa només s'esdevé quan l'enzim estén l'ADN des de l'encebador fins a la regió on es troba la sonda hibridada. La dependència d'aquest assaig de la polimerització assegura que la degradació de la sonda succeeixi només si la seqüència diana s'amplifica, per tant, s'eviten deteccions inespecífiques. La PCR quantitativa a temps real permet determinar el punt on la reacció comença a detectar-se. En aquest punt la reacció és exponencial, i el número de còpies en aquest punt és proporcional al número de còpies inicial. Com més gran sigui el nombre de còpies inicial de la diana, abans es detectarà la fluorescència. El punt on es comença a detectar aquesta fluorescència es defineix com a cicle umbral (*cycle threshold*: CT). Definint correctament una corba estàndard, aquest CT fàcilment pot convertir-se en quantitat de producte i, per tant, obtenir una quantificació precisa.

Els assaigs *TaqMan SNP Genotyping Assays* serveixen per genotipar SNPs. El producte utilitza l'assaig nucleasa 5' per amplificar i detectar els al·lels específics de l'SNP en mostres d'ADN genòmic purificat. Cada assaig és específic per un SNP. Cada *SNP Genotyping Assay Mix* conté la seqüència específica dels primers *forward* (directe) i *reverse* (inversa) per amplificar l'SNP d'interès i dos sondes TaqMan<sup>®</sup> MGB per detectar els al·lels. Cada sonda TaqMan MGB conté una sonda marcada amb el fluoròfor (*dye*) VIC<sup>®</sup> que detecta la seqüència de l'al·lel 1 (s'uneix al 5' de l'al·lel 1) i una sonda marcada amb el fluoròfor FAM<sup>™</sup> que detecta l'al·lel 2 (s'uneix al 5' de l'al·lel 2); i conté un *minor groove binder* (MGB): aquesta modificació fa augmentar la temperatura de fusió (*melting temperature* ( $T_m$ ): és la temperatura en la qual el 50% de l'ADN està estable en forma de doble hèlix i l'altra 50% està separat en forma de cadena única) sense haver augmentat la longitud de la sonda (Afonina I. i col., 1997; Kutuyavin i col., 1997), fet que permet el disseny de sondes curtes. Aquest resultat en

grans diferències en els valors de  $T_m$  entre sondes aparellades i no aparellades, produeix una més acurada discriminació al·lèlica. Per últim conté un *quencher* (apagador de la senyal) no fluorescent (NFQ) al final del 3' de la sonda.

Durant la PCR ocorren els següents esdeveniments:

1-Cada sonda TaqMan MGB s'anella específicament a la seqüència complementària entre els llocs dels primers *forward* i *reverse*. Quan la sonda està intacta, la proximitat del fluorocrom *reporter* al fluorocrom *quencher* dona supressió de la fluorescència del *reporter* mitjançant la transferència d'energia tipus Förster (Förster, 1948; i Lakowicz JR., 1983).

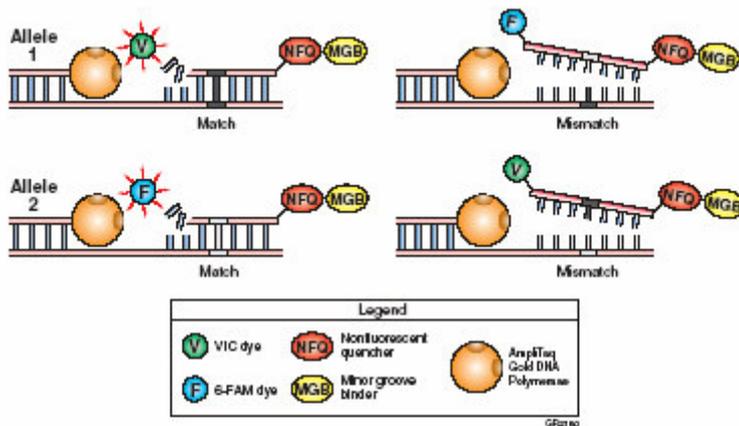
2-La polimerasa AmpliTaq Gold<sup>®</sup> ADN separa només les sondes que han hibridat amb la diana.

3-L'escisió separa el *reporter dye* del *quencher dye*, el qual dona un augment de la fluorescència mitjançant el *reporter*. L'increment de fluorescència només s'esdevé si la seqüència diana amplificada és complementària a la sonda. Així, la senyal fluorescent generada per l'amplificació de la PCR indica quins al·lels estan a la mostra.

Les unions inespecífiques o mals aparellaments (*mismatches*) entre una sonda i la diana redueixen l'eficiència de la hibridació de la sonda. A més a més, la *AmpliTaq Gold ADN polymerase* és més probable que desplaci una sonda mal unida sense separar-la, fet que no donaria senyal de fluorescència (Figura 3.1.).

Sempre que s'ha preparat una placa, s'han destinat alguns pous a controls i a blancs. Els controls són mostres analitzades per duplicat en una mateixa placa i en plaques diferents (controls intrassaig i interassaig) per verificar que el resultat és el mateix i, per tant, ja se'n coneixen els al·lels. El resultat obtingut dels duplicats ha d'ésser al 100% igual, si hi ha dubtes és a causa que l'ADN no ha amplificat correctament i això significa que s'ha malmès o està contaminat; en aquests casos es torna a diluir l'ADN mare o bé es fa

una nova extracció. D'aquests controls s'utilitzen dos heterozigots, dos homozigots per A i dos homozigots per G per placa, i serveixen per comparar resultats. I els blancs són pous que tenen el mateix contingut que la resta però enlloc d'ADN contenen aigua destil·lada, per tal de comprovar que amb la manipulació no hi hagi contaminació (no hi ha d'haver amplificació, doncs, en aquests pous).



The table below shows the correlation between fluorescence signals and sequences present in the sample.

A substantial increase in...	Indicates...
VIC dye fluorescence only	homozygosity for Allele 1.
FAM dye fluorescence only	homozygosity for Allele 2.
both fluorescent signals	Allele 1-Allele 2 heterozygosity.

**Figura 3.1.:** Unions (*matches*) i males unions (*mismatches*) entre la seqüència diana i la sonda en TaqMan SNP Genotyping Assays . *Livak KJ. i col., 1995.*

El genotip de SP-D 92A>G es determina per la PCR-RT mitjançant l'amplificació del fragment d'ADN d'interès i la discriminació al·lèlica de l'SNP en qüestió: rs721917 de la base de dades de SNPs de la NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). L'aparell utilitzat

és un ABI PRISM<sup>®</sup> 7000 (sistema de detecció de seqüències). S'utilitza l'assaig d'*AppliedBiosystems* 4331183 Taqman(R) SNP Genotyping Assays C\_\_\_1362980\_10 81521 i es discrimina entre els al·lels G (al·lel salvatge i menys freqüent en la població caucasiana) i l'al·lel A (al·lel mutat i més freqüent). Cada assaig per genotipar SNPs consisteix en un únic tub que conté els dos *primers* (o cebadors, conjunt d'oligonucleòtids) (*forward* i *reverse*) per amplificar la seqüència d'interès i una sonda per la detecció al·lèlica; la seqüència específica dels *primers forward* i *reverse* per amplificar el fragment d'ADN per aquest SNP són, respectivament: CCTGGAAGCAGAAATGAAGACCTA i CCAC TCTCCACTGAGCACATG (Leth-Larsen R. i col., 2005) (que, de fet, no ve donada per la casa comercial), i la sonda TaqMan: CATGACCAGGGTGCAAGCACTGGGC[A/G]TTGTTCTGTGGGAGTAG GTCTTCAT (VIC/FAM). Un fluoròfor (*dye*) s'uneix a cada al·lel: el *dye* VIC s'uneix al final del 5' de l'al·lel A (color verd) i el fluoròfor FAM s'uneix al final del 5' de l'al·lel G (color vermell). En aquest estudi s'utilitza la TaqMan<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix per amplificar l'ADN. Es fa una mescla de 2 µl d'ADN a concentració 10ng/µl, 12.5 µl de TaqMan<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix, i 9.25 µl d'aigua (s'obté un volum total de 25 µl) per pou. Les condicions d'amplificació d'ADN són: un pas previ de 10 minuts a 95°C (HOLD). Seguidament es realitzen 15 segons de desnaturalització de l'ADN a 94°C, i un minut d'anellament i extensió de 60°C, durant 40 cicles. Un cop amplificat ja es pot passar a la discriminació al·lèlica. Finalment els resultats són analitzats amb el software ABI Prism 7000 SDS.

### **3.2.5. MESURA DE LA CONCENTRACIÓ DE SP-A**

La mesura de la concentració de l'SP-A ha estat una gentilesa de l'equip del Dr. Masanori Shiratori del Third Department of Internal Medicine de la Sapporo Medical University School of Medicine de Sapporo (Japó).

La mesura de la concentració de SP-A s'ha fet mitjançant el sistema d'assaig ELSIA F300 utilitzant kits d'immunoassaig enzimàtic (EIA) (SP-A test "Kokusai"®) procedents de Sismex Corporation (Kobe, Japó). S'ha seguit la metodologia descrita per Shimizu H. i col·laboradors amb petites adaptacions (Shimizu H. i col., 1989). Es tracta d'un EIA tipus *sandwich* que es porta a terme mitjançant 2 anticossos monoclonals contra l'SP-A humana: PE10 i PC6. S'utilitzen 50 µl de sèrum de cada pacient.

El coeficient de variació intraassaig és del 4.4% a concentracions de 51.3 ng/ml i del 2.9% a 91.1 ng/ml. El coeficient de variació interassaig és del 4.6 i del 3.5% a concentracions de 38.0 i 92.4 ng/ml, respectivament (Takahoshi H. i col., 2000).

### **3.2.6. MESURA DE LA CONCENTRACIÓ D'ALFA-DEFENSINES**

La concentració d'alfa-defensines s'ha mesurat en plasma EDTA mitjançant un kit comercial d'ELISA (Hycult biotechnology b.v., Uden, The Netherlands) que permet detectar les tres defensines principals (HNP 1-3 (*Human neutrofil peptide 1, 2 i 3*)). Les mostres han estat centrifugades a 4 °C i el plasma s'ha separat ràpidament per evitar la desgranulació dels leucòcits o l'apoptosi.

Aquesta ELISA és un immunoassaig enzimàtic de tipus *sandwich* en què les mostres s'incuben en una placa amb anticossos que reconeixen les HNP 1-3. Durant la incubació, les HNP 1-3 queden unides als anticossos i el material sobrant és eliminat

mitjançant rentats. L'anticòs secundari biotinitat s'unirà a l'anticòs primari, i l'excés d'anticòs secundari serà eliminat mitjançant rentats. S'afegeix el conjugat estreptavidinaperoxidasa que s'unirà a l'anticòs biotinitat. S'elimina l'excés de estreptavidinaperoxidasa mitjançant rentats. I s'afegeix el TMB (tetrametilbenzidina). S'atura la reacció amb àcid cítric i es mesura l'absorbància a 450 nm amb un espectrofotòmetre.

La sensibilitat de l'assaig és de 50 pg/ml i el rang de concentració mesurable és de 41 pg/ml a 10.000 pg/ml. El CV intraassaig i interassaig és inferior al 10%.

### **3.2.7. MESURA DE LA CONCENTRACIÓ DE VISFATINA**

La concentració de la visfatina s'ha mesurat en sèrum, plasma EDTA i plasma citrat (segons la mostra) a través del kit comercial d'immunoassaig enzimàtic (EIA: enzimimmunoassaig) de Phoenix Pharmaceuticals (Belmont, CA). Aquest immunoassaig enzimàtic està dissenyat per detectar un pèptid específic i els pèptids que venen al kit es basen en el principi d'immunoassaig enzimàtic "competitiu". La placa que ve en el kit presenta un anticòs secundari i els llocs no específics seran bloquejats. L'anticòs secundari pot unir-se al fragment Fc de l'anticòs primari (anticòs del pèptid); el fragment Fab del pèptid s'unirà competitivament amb el pèptid biotinitat i el pèptid estàndard o amb el pèptid diana en les mostres. El pèptid biotinitat interactua amb la SA-HRP (*streptavidin-horseradish peroxidase*) la qual catalitza la solució de substrat composta de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina i peròxid d'hidrogen per produir una solució de color blau. La reacció enzim-substrat s'atura amb àcid clorhídric (HCl) i la solució passa a tenir un color groc. La intensitat del color groc és directament proporcional a la quantitat del complex SA-HRP-pèptid biotinitat, però inversament

proporcional a la quantitat de pèptid en les solucions estàndards o mostres. Això és degut a que el pèptid biotinilat i el pèptid estàndard o les mostres competeixen per unir-se a l'anticòs primari. D'aquí se n'obté una corba estàndard de concentració coneguda. I les mostres de concentració desconeguda es determinen extrapolant-ne el valor de l'absorbància (lectura que es fa a 450 nm) a la corba estàndard.

La sensibilitat de l'assaig és de 0.1ng/ml i el rang de concentració mesurable és de 0.1 ng/ml a 1000 ng/ml. El coeficient de variació intraassaig és inferior al 5%, mentre que l'interassaig és inferior al 14%.

Per comprovar els resultats s'han analitzat les mostres en paral·lel amb un altre kit de visfatina (Human Visfatin ELISA kit, Grupo TAPER, AdipoGen, Seoul, Korea). Es tracta d'una ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) per quantificar visfatina en sèrum, plasma o teixits humans o en sobrenedant de cultius cel·lulars. Presenta una placa de 96 pouets amb anticòs monoclonal de visfatina humana que s'unirà a la visfatina de les mostres, controls i estàndards. La visfatina unida és capturada per un anticòs policlonal antivisfatina humana. S'afegeix el detector *HRP conjugated anti-rabbit IgG*. Després de rentats s'afegeix la solució substrat. La intensitat de color que s'obté és proporcional a la quantitat de visfatina present. Finalment s'afegeix la solució de Stop i es llegeix a 450nm.

El rang de concentració mesurable és de 16ng/ml a 100pg/ml. El coeficient de variació intrassaig és inferior al 6% i el interassaig és inferior al 10%.

### **3.3. ESTUDI *IN VITRO*: CULTIUS CEL·LULARS**

S'ha treballat amb dues línies cel·lulars per estudiar *in vitro* si el tractament de les cèl·lules pulmonars amb insulina i glucosa estimula la secreció i/o expressió de l'SP-D.

S'ha treballat amb la línia cel·lular d'adenocarcinoma de pulmó H441 i amb la línia cel·lular epitelial de pulmó A549 que presenta característiques similars a les cèl·lules epitelials alveolars tipus II i produeix surfactant pulmonar.

S'han cultivat  $0.75 \cdot 10^6$  cèl·lules/placa en 10 plaques de petri de plàstic de 100 mm de diàmetre per cada una de les línies cel·lulars a 37 °C en condicions d'humitat d'un 95% d'aire i un 5% de CO<sub>2</sub> durant 24 hores. El medi de cultiu emprat és:

---

---

#### Per la línia cel·lular H441

RPMI 1640 (4.5 g/l glucosa) (500 ml, GIBCO)

Sèrum Fetal Boví (10%, Cell Culture Division)

L-Glutamina (2mM, GIBCO)

Penicil·lina-G (50 U/ml, GIBCO)

Estreptomicina (50 ug/ml, GIBCO)

HEPES (10mM, SIGMA)

Sodipiruvat (1mM, GIBCO)

#### Per la línia cel·lular A549

DMEM (4.5 g/l glucosa) (500 ml, GIBCO)

Sèrum Fetal Boví (10%, Cell Culture Division)

L-Glutamina (2mM, GIBCO)

Penicil·lina-G (50 U/ml, GIBCO)

Estreptomicina (50 ug/ml, GIBCO)

---

---

Al cap de 24 hores se'ls canvia el medi i s'afegeix el mateix medi anterior però amb DCI (dexametasona, 8-Bromoadenosina 3,5-adenosín monofosfat cíclic (cAMP) i 3-Isobutil-1-metilxantina) per estimular l'expressió de SP-D (Cao Y. i col., 2003) i s'incuben a les mateixes condicions anteriors però durant 72 hores.

---

DCI

Dexametasona (10 nM, SIGMA)

8-Bromoadenosina 3,5-adenosín monofosfat cíclic (8-Br-cAMP) (10 nM, SIGMA)

3-Isobutil-1-metilxantina (100 nM, SIGMA)

---

Després de 72 hores es renten les cèl·lules amb PBS (GIBCO) i se'ls canvia el medi. S'afegeix el mateix medi anterior però sense FBS (medi de deprivació) i sense DCI però amb els següents tractaments:

- 1-Una placa sense res que servirà de control.
- 2-Una placa amb insulina a concentració 1 ng/ml (Insulina procedent de pàncrees boví, SIGMA).
- 3-Una placa amb insulina a concentració 10 ng/ml.
- 4-Una placa amb insulina a concentració 100 ng/ml.
- 5-Una placa amb glucosa a concentració 5.5 mM (SIGMA).
- 6-Una placa amb glucosa a concentració 11 mM.
- 7-Una placa amb glucosa a concentració 22 mM.
- 8-Una placa amb insulina 1 nM + glucosa 5.5 mM.
- 9-Una placa amb insulina 10 nM + glucosa 11 mM.
- 10-Una placa amb insulina 100 nM + glucosa 22 mM.

El medi amb el tractament es deixa 24 hores després de les quals es tripsinitzen les cèl·lules (veure 3.3.4.1. Protocol de tripsinització de cultius cel·lulars). Es recull el

sobrenedant (medi de cultiu + els productes de secreció de les cèl·lules) per fer una ELISA de SP-D; i es guarda el pèl·let de cèl·lules per lisar-les.

### **3.3.1. EXTRACCIÓ D'ARN**

Per fer l'extracció d'ARN del pèl·let de cèl·lules s'utilitza un kit comercial amb sistema de columnes (Nucleospin RNA II Macherey-Nagel total RNA isolation). El procés d'extracció d'ARN conté els diferents passos:

1-Lisi cel·lular: s'utilitza el  $\beta$ -mercaptoetanol per reduir els enllaços disulfur de les proteïnes i una solució o tampó de lisi del mateix kit que conté una gran quantitat d'ions *chaotropics* (que causen disrupció de les estructures moleculars formades per forces no covalents com els ponts d'hidrogen, les forces de van der Waals i els efectes hidrofòbics). Aquest tampó de lisi immediatament inactiva les ARNases i crea unes condicions apropiades per tal que l'ARN s'absorbeixi a la membrana de silici de la columna.

2-Filtració del lisat

3-Unió de l'ARN al filtre (i també de l'ADN)

4-Digestió de l'ADN: mitjançant una solució rDNase que s'aplica directament a la membrana de silici

5-Rentats i Secat de la membrana: mitjançant dos tampons diferents per eliminar les sals, els metabòlits, i els components macromoleculars de les cèl·lules.

6-Obtenció de l'ARN pur: diluït amb aigua *RNase-free*.

Per conèixer l'estat de l'ARN s'ha preparat una dilució 1:20 (3  $\mu$ l d'ARN i 57 d'aigua) amb aigua bidestil·lada i s'ha mesurat l'absorbància a 260nm i 280nm en un espectrofotòmetre amb làmpada UV. Un cop s'obtenen les absorbàncies dels ARN el mateix aparell calcula les concentracions d'ARN a partir de la següent equació:

$$\text{Concentració d'ARN } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = (\text{Absorbància a } 260\text{nm}) \times (\text{Dilució}) \times (40) / 1000$$

Se sap d'entrada que 1 densitat òptica a 260nm ( $1OD_{260}$ ) = 40  $\mu$ g d'ARN. La relació d'absorbàncies a 260/280 indica la puresa de l'ARN i es considera que les relacions properes a 2.0 unitats d' $OD_{260}$  són les òptimes.

Per determinar la integritat de l'ARN total extret es sotmeten les mostres a una electroforesi horitzontal en gel d'agarosa a l'1% tenyit amb bromur d'etidi (0.5  $\mu$ g/ml, MERCK). La tècnica d'electroforesi es basa en el desplaçament de l'ARN, en aquest cas, a través d'una matriu porosa formada per l'agarosa polimeritzada (ECOGEN SRL) en la qual la mida del porus es determina per la concentració d'agarosa en una solució de sals (TBE Buffer 1X, Invitrogen). A l'aplicar-se un corrent elèctric a través del gel, els àcids nuclèics, que tenen càrrega negativa causada pels grups fosfat, migren cap a l'ànode en condicions de pH neutre.

Per la preparació i l'electroforesi del gel (1%) es requereixen:

Tampó TBE (1X) (solució tampó) (50 ml)

Agarosa (0.50 g)

Una càmera d'electroforesi amb pinta de pues de 2.5 mm

Es mesclen 5  $\mu$ l de la mostra d'ARN amb 2  $\mu$ l de tampó de càrrega i es carreguen als pous del gel. L'electroforesi es realitza a 98 V durant uns 15 minuts aproximadament (un cop les mostres han migrat un 70% del gel). L'ARN s'observa en un transil·luminador amb llum ultraviolada a 260 nm (i es visualitza a través del Software GeneSnap). La radiació UV és absorbida per l'ARN i emesa al bromur d'etidi que, a la vegada, reemet la radiació a 590 nm a la regió vermell-taronja de l'espectre visible. Els resultats s'enregistren en fotos Polaroid.

Si l'ARN està íntegre s'obtindran dues bandes úniques i clares corresponents a la subunitat gran de l'ARN ribosomal (28 S) i a la subunitat petita de l'ARN ribosomal (18

S) per ordre de càtode a ànode. La banda 28 S més o menys serà el doble d'intensa que la 18 S.

### **3.3.2. RETROTRANSCRIPCIÓ DE L'ARN (síntesi d'ADN complementari)**

La retrotranscripció serveix per passar aquest ARN a ADNc per tal d'amplificar posteriorment el gen que interessa a partir de l'ADN obtingut. L'ADN és més estable i, per tant, és més còmode treballar amb ADN que amb ARN. La retrotranscripció es porta a terme justament després de l'extracció d'ARN per tal de no congelar-lo però mantenint-lo en gel. L'ARN és molt sensible a les ARNases i als cicles de congelació i descongelació. En cas de no poder realitzar la retrotranscripció el mateix dia es congela a  $-80^{\circ}\text{C}$  i només s'utilitzarà una sola vegada (és a dir, se'n farà una única descongelació).

La retrotranscripció es realitza mitjançant un kit comercial que utilitza la reacció en cadena de la transcriptasa inversa (PCR-RT) (High-Capacity cDNA Reverse Transcription archive kit; Applied Biosystems). La quantitat d'ARN utilitzada per fer la retrotranscripció ha de ser d'entre 1 a 10  $\mu\text{g}$  per mostra (sempre s'ha utilitzat la mateixa quantitat en totes les mostres per estandarditzar paràmetres) i servirà com a motlle de la reacció. Els hexàmers a l'atzar actuen com a cebadors. Es necessita dNTP que funcionen com a substrat per la transcriptasa inversa.

Si es vol un volum final de 100  $\mu\text{l}$  d'ADNc per mostra s'utilitzaran:

---

5  $\mu\text{g}$  d'ARN + Aigua (DEPC treated water pyrogen-free certified DNase/RNase free, Invitrogen) fins a un volum final de 50  $\mu\text{l}$

+

5  $\mu\text{l}$  reverse transcription buffer (10x, Applied BioSystems)

4 µl dNTP (100 mM, Applied BioSystems)  
10 µl random primers (10x, Applied BioSystems)  
5 µl RNase Inhibitor (Applied BioSystems)  
5 µl multiscribe reverse transcriptase (50 U/ µl, Applied BioSystems)  
16 µl aigua lliure de nucleases per arribar als 50 µl finals (DEPC treated water, Invitrogen)

---

A cada retrotranscripció s'ha introduït un control negatiu (sense ARN) per tal de comprovar que no hi ha contaminacions externes.

Les condicions del termociclador són les següents:

Cicle de desnaturalització: 25 °C durant 10 minuts.

Cicle de síntesi d'ADNc i desnaturalització de l'enzim: 37°C durant 120 minuts.

Cicle de desnaturalització d'enzims: 85° durant 5 segons

Finalment s'obté una cadena d'ADN complementari (ADNc).

Per comprovar l'estat de l'ADNc es corre un gel d'agarosa. S'ha d'obtenir una sola banda (en forma de llapissada) sense artefactes per verificar la puresa d'aquest ADNc.

### **3.3.3. PCR (REACCIÓ EN CADENA DE LA POLIMERASA) DEL GEN DE L'SP-D I DE LA BETA-ACTINA**

La PCR consisteix en l'amplificació logarítmica d'un segment definit d'ADN.

Per amplificar les regions d'interès els assajos de PCR es realitzaren amb els reactius següents:

---

2 µl d'ADNc  
5 µl PCR Buffer II (10x, Applied BioSystems)  
3 µl MgCl<sub>2</sub> (25mM, Applied BioSystems)  
1 µl dNTP (10 mM, Applied BioSystems)  
2 µl de cada un dels oligonucleòtids (*forward* i *reverse*, entre 25µM i 50µM, Sigma-Proligo)  
0.5 µl Taq-polimerasa (5U/ µl, AmpliTaq Gold, Applied BioSystems)  
Aigua lliure de nucleases per completar la reacció a un volum de 50 µl totals (34.5 µl) (DEPC treated water pyrogen-free certified DNase/RNase free, Invitrogen)

---

Condicions del termociclador i *primers*:

---

**Gen de l'SP-D** (Kang W. i col., 2002)

Seqüència d'oligonucleòtids o Cebadors (50µM)

*Forward*: 5'-AGCTGGGCCCAAAGGAGAAGTAGG-3'

*Reverse*: 5'-AGCGGCAGAGCGTGGAGAGG-3'

Mida del producte de PCR: 466 pb

Condicions del termociclador:

Desnaturalització inicial o *Hold*: 94°C 5min

35 cicles:

Desnaturalització: 94°C 30s

Hibridació: 61.5°C 30s

Extensió: 72°C 40s

---

Com a control d'expressió constitutiva s'utilitza el gen de la beta-actina. Les condicions de PCR per la β-actina són les següents:

---

**Gen de la Beta-actina** (Pauschinger M. i col., 1999)

Seqüència d'oligonucleòtids o Cebadors (25µM)

*Forward:* 5'-TACATGGCTGGGGTGTGAA-3'

*Reverse:* 5'-AAGAGAGGCATCCTCACCT-3'

Mida del producte de la PCR: 219 pb

Condicions del termociclador:

Desnaturalització inicial o *Hold*: 94°C 5min

35 cicles:

Desnaturalització: 94°C 45s

Hibridació: 64°C 45s

Extensió: 72°C 45s

---

Després de l'amplificació els productes obtinguts de les PCR es van sotmetre a una electroforesi en un gel d'agarosa horitzontal (2 %) amb bromur d'etidi (0.5 µg/ml). S'agafen 5 µl del producte de PCR i 2 µl de tampó de càrrega (*loading buffer*).

Per la preparació i l'electroforesi del gel (1.5%) es requereixen:

Tampó TBE (1X) (tris-borat EDTA, solució tampó) (50 ml)

Agarosa (1 g)

Una càmera d'electroforesi amb pinta de pues de 2.5 mm

Les mostres es dilueixen amb tampó de correguda: 2 µl de tampó per 5 µl de mostra d'ADN. Al gel se li apliquen 98 V durant 15 minuts aproximadament (fins aconseguir una migració de les mostres del 70% en el gel). Els productes amplificats per PCR es visualitzen en el gel mitjançant llum UV tal i com es descriu anteriorment. Els resultats s'enregistren en fotos Polaroid.

Per saber si la banda obtinguda en el gel correspon a la zona amplificada que interessa s'ha utilitzat un marcador de pes molecular (DNA Ladder 1kb plus, Invitrogen) d'escala de 100 parells de bases.

A cada PCR s'utilitza un control negatiu sense ADN per tal de comprovar que no hi ha contaminacions externs.

Finalment s'escanegen les fotografies obtingudes i s'analitza la densitat de les bandes a través del programa informàtic Scion Image.

### **3.3.4. PROTOCOLS D'ÚS PER CULTIUS CEL·LULARS**

El medi de cultiu per mantenir les cèl·lules en el suport de poliestirè es canvia cada dos dies per tal que les cèl·lules tinguin els nutrients necessaris i en bon estat. La confluència òptima (i màxima) per tripsinitzar les cèl·lules és del 80-90%.

Tots els experiments s'han realitzat com a mínim per triplicat per tenir rèpliques dels resultats.

#### **3.3.4.1. Protocol de tripsinització de cultius cel·lulars**

1. Retirar el medi de la placa de petri de 100 mm de diàmetre (o del flascó de 75 cm<sup>2</sup>)
2. Afegir uns 8 ml de PBS (solució tampó fosfatada) (GIBCO) (o 10 ml si es tracta d'un flascó de 75 cm<sup>2</sup>), que es manté a temperatura ambient, per tal de rentar la placa de les restes de FBS (sèrum fetal boví) que poden quedar-hi i que inhibirien l'acció de la tripsina
3. Retirar el PBS

4. Afegir uns 4 ml de tripsina (GIBCO) (o 6 ml si es tracta d'un flascó de 75 cm<sup>2</sup>) per tal que les cèl·lules es desenganxin de la base
5. Deixar la placa a l'incubador a 37°C durant uns 5 minuts per tal que actuï la tripsina
6. S'observa la placa al microscopi per comprovar que les cèl·lules s'han desenganxat
7. S'afegeixen 9 ml de medi al 10% de FBS per tal d'inactivar l'acció de la tripsina
8. Es recull tot el contingut de la placa (cèl·lules, medi i tripsina) en un tub de 15ml i es centrifuga durant 5 minuts a 10°C i a 1500 rpm per eliminar la tripsina i obtenir les cèl·lules
9. Es retira el sobrenedant i s'obté un pèl·let de cèl·lules al fons del tub
10. Si es vol extreure l'ARN del pèl·let de cèl·lules
  - a. Es resuspèn el pèl·let amb 1ml de PBS fred (2-8°C)
  - b. Es transfereix en un tub de 1.5 ml i es centrifuga durant 5 minuts a 10°C i a 1500 rpm
  - c. Es retira el PBS i s'obté un pèl·let de cèl·lules net de restes de medi de cultiu
  - d. Es fa l'extracció d'ARN directament o es congelen els pèl·lets a -80°C

I si el pèl·let de cèl·lules es vol utilitzar per sembrar altres plaques es resuspèn amb 1 ml de medi de cultiu i es fa un comptatge per tal de sembrar la quantitat de cèl·lules que interessa.

**3.3.4.2. Protocol de comptatge de cèl·lules viables**

1. Posar 10 µl de suspensió cel·lular en un tub de 1.5 ml i afegir 90 µl de blau tripà (Trypan blue, Biochrom AG 0.5% (w/v) in physiological saline). Es barreja bé.
2. Es col·loquen 10 µl d'aquesta mescla en una cambra de Neubauer i es compten les cèl·lules refringents blanques (cèl·lules vives) dels requadres. La concentració cel·lular es calcula de la següent manera:

$$\text{Cèl·lules/ml} = (\text{mitjana del n}^\circ \text{ de cèl·lules per requadre}) \times (\text{factor de dilució (1/10)}) \times 10^4$$

<sup>i</sup> 10<sup>4</sup> és el número total de cèl·lules que caben a la cambra de Neubauer

El percentatge de viabilitat es calcula amb la següent fórmula:

$$(\text{n}^\circ \text{ cèl·lules viables} / \text{n}^\circ \text{ cèl·lules totals}) \times 100$$

**3.3.4.3. Protocol de congelació de cèl·lules**

1. Tripsinitzar el cultiu i fer un comptatge cel·lular
2. Separar en un tub el volum de suspensió cel·lular equivalent al nombre de cèl·lules que volem congelar (no és convenient congelar menys de 1x10<sup>6</sup> cèl·lules/criotub)
3. Centrifugar durant 5 minuts a 10°C a 1500 rpm
4. Resuspendre el pèl·let amb 900 µl de medi de cultiu al 10% de FBS i ho transferim a un criotub i ho mantenim en gel
5. S'afegeixen 100 µl de DMSO (dimetil sulfòxid 99.5% GC, Sigma-Aldrich)
6. Es congela immediatament i de forma gradual, primer a -20°C. Al cap d'entre 4-24 hores es conserva a -80°C i passades unes 24 hores ja es poden guardar en nitrogen líquid (-180°C)

**3.3.4.4. Protocol de descongelació de cèl·lules**

1. S'extreu el criotub del contenidor de nitrogen líquid i es descongela una mica posant-lo al bany a 37°C
2. Quan el contingut del criotub encara està en estat de glaçó s'hi afegeixen gotes de medi de cultiu i es va transferint, a mesura que es va desfent, a un tub de 15 ml amb una 13 ml de medi de cultiu (al 10% de FBS). És important que les cèl·lules estiguin el menor temps possible en contacte amb el DMSO ja que és tòxic i les danyaria
3. Es centrifuga el tub durant 5 minuts a 10°C i a 1500 rpm
4. Es descarta el sobrenedant (medi + DMSO) i es resuspèn el pèl·let (cèl·lules) amb medi de cultiu i es sembra en un flascó o placa amb la quantitat de medi de cultiu necessària

**3.3.4.5. Preparació del tampó de càrrega (*loading buffer 10x*)**

Per obtenir el tampó de càrrega de gels d'agarosa es mesclen els següents productes:

1. 20% (pes/volum) Ficoll 400
2. 1.0% (pes/volum) SDS (Sodi dodecilsulfat, Sigma-aldrich)
3. 0.1 M Na<sub>2</sub>EDTA (àcid etilendiemintetraacètic, Panreac Quimica)
4. 0.25% (pes/volum) Bromofenol blau (AMRESCO)
5. 0.25% (pes/volum) Xilen cianol Xylene Cyanol (AMRESCO)

D'aquesta mescla es prepara una dilució 2X (200 µl de la mescla + 800 µl d'aigua destil·lada) per obtenir el tampó definitiu per córrer els gels d'agarosa.

### **3.4. MÈTODES ESTADÍSTICS**

Les anàlisis estadístiques s'han realitzat utilitzant el programa SPSS versió 12.0. A no ser que estigui indicat d'una altra manera, els resultats descriptius de variables contínues estan expressats com a mitjana i desviació estàndard (SD) per variables Gaussianes i com a mediana i rang interquartil per les variables no Gaussianes. Abans de l'anàlisi estadística, s'ha avaluat si les variables segueixen una distribució normal i homogènia utilitzant el test de Levene, i les variables no normals (en l'estudi de l'SP-D:  $S_I$ ,  $S_G$ , triglicèrids, LBP i SP-D; en l'estudi de l'SP-A:  $S_I$ , triglicèrids i SP-A) s'han transformat en escala logarítmica, i la seva significació és testada en aquesta escala. La relació entre variables s'analitza mitjançant correlació simple (utilitzant el test de Pearson) i regressió múltiple en passos successius. S'utilitzen el test de chi-quadrat per comparar proporcions, i test de Student i ANOVA (amb test post-hoc Turkey) per a mostres no aparellades per comparar variables quantitatives (com per exemple comparar diferències entre homes i dones).

Per comparar les concentracions de SP-D entre el pre- i el posttractament (estudi del trifusal) s'utilitza un model lineal general per mesures repetides amb correcció de Bonferroni. El model lineal general també s'utilitza per calcular els valors de SP-D circulants després d'ajustar per l'edat i l'IMC.

S'ha utilitzat, també, un model lineal general per calcular els valors de SP-A circulants després d'ajustar per l'edat i l'IMC.

Per trobar diferències en la concentració sèrica de visfatina entre grups s'utilitza una ANOVA univariant i una anàlisi de covariància utilitzant models lineals generals

(corregint per sexe, edat, IMC o HbA1c). Els nivells de significació estadística es fixaren a  $P < 0.05$ .

Per un valor de  $P = 0.05$ , l'estudi té una capacitat del 80% per detectar correlacions significatives (coeficient de Pearson de com a mínim 0.3) entre la visfatina sèrica i paràmetres metabòlics en tests bilaterals. L'estudi és capaç de detectar una diferència significativa de visfatina circulant de com a mínim una SD de 0.5 entre no DM i DM 2.

Per observar diferències en la concentració plasmàtica de DEFA 1-3 entre grups s'utilitza també una ANOVA univariant i una anàlisi de covariància utilitzant models lineals generals (corregint per l'edat, l'IMC, el colesterol en sèrum, la sensibilitat a la insulina o el fet de fumar), amb correcció de Bonferroni com a test post-hoc. Els nivells de significació estadística es fixaren també a  $P < 0.05$ .

Per un valor de  $P = 0.05$ , l'estudi té una capacitat del 80% per detectar correlacions significatives entre les DEFA1-3 sèriques i els diferents paràmetres metabòlics i vasculars (coeficient de Pearson de com a mínim 0.26 i 0.38, respectivament) en tests bilaterals. L'estudi té una capacitat de detecció de diferències significatives d'una SD a partir de 0.4 en el colesterol total i el colesterol LDL entre subjectes entre el quartil inferior i el quartil superior per DEFA 1-3; i de diferències a partir d'una SD de 0.6 tant en la vasodilatació endotelidependent com en la vasodilatació endoteliindependent entre subjectes amb concentracions de DEFA 1-3 tant per sobre com per sota els valors mitjans corresponents.

**3.5. EQUIPAMENT I MATERIAL QUÍMIC I BIOLÒGIC**

Al llarg d'aquest treball experimental s'han utilitzat els aparells que figuren a la taula següent. Els kits i productes químics i biològics utilitzats han sorgit en la descripció anterior dels mètodes.

**Taula 3.1.****EQUIPAMENT DE RECERCA UTILITZAT**

<i>EQUIP</i>	<i>MARCA</i>	<i>MODEL</i>	<i>ANY</i>
Ultracongelador -80°C	Sanyo	MDF-U71V	2003
Ultracongelador -80°C	Sanyo	MDF-U70V	2001
Nevera +2-+8°C	Bosch	Cooler	2005
Congelador -20°C	Bosch		2005
Fàbrica de gel	BAR-LINE	BF-85-AS	2003
Lector de plaques d'ELISA	ROSYS	anthos 2010	2004
Agitador plaques ELISA	Heindolph	Titramax 100	2003
Incubador plaques ELISA	Cope Cod	Pyroblock 2	2003
Vòrtex	Scientific Industrial	Genie-2	2003
Vòrtex	Technokartell	TK3S	2003
Dispensador automàtic	Drummond	Pipet-Ais	2003
Cabina de flux laminar	Telstar	MINI-V/PCR	2003
Microcentrífuga	Jouan	A14	2003
PCR real time	Applied Biosystems	ABI Prism 7000	2003
Ordinador portàtil	DELL	Lattitude C810	2003
Micropipeta 2-20µL	GILSON	P20PIPETMAN	2003
Micropipeta 0,2-2 µL	GILSON	P2PIPETMAN	2003
Micropipeta 10-200 µL	GILSON	P200PIPETMAN	2003
Micropipeta 200-1000 MI	GILSON	P1000PIPETMA	2003
Micropipeta 1-10 µL	GILSON	P10PIPETMAN	2003
Micropipeta Multicanal	Nichiryo	Nichipet 7000 40-200 µl	2003
Bany amb agitació	P SELECTA	Unitronic OR	2003
Bloc tèrmic (bany de terra)	SELECTA	Tenbloc (x 18 eppendorf)	2003
Espectrofotòmetre	HITACHI	U-1800	2003

SUBJECTES, MATERIALS I MÈTODES

---

Lector d'imatges (gels agar)	SYNGENE	Multigenius	2003
Font d'electroforesi d'alt voltatge	CONSORT	E833	2003
Font d'electroforesi d'alt voltatge	BIO-RAD	POWER-PAL 300	2003
Cubetes d'electroforesi horitzontals (gran: 20x20 cm i petita: 8x10 cm)	CONSORT		2003
Sistema d'electroforesi d'alta resolució	AMERSHAM	GENEPHOR	2003
Microones	SANYO		2003
Balança electrònica de precisió	OHAUS	N22120	2003
Balança analítica electrònica	OHAUS	E02140	2003
Cabina d'extracció de gasos	CAPTAIR (ERLAB)	Filtair 824 M/BE	2004
Termociclador	APPLIED BIOSYSTEMS	GeneAmp 2700	2004
Termociclador	APPLIED BIOSYSTEMS	ThermalCycler 2720	2007
Termociclador	BIORAD	MyCycler	2003
Termociclador	BIORAD	MyCycler	2005
Termociclador	HYBAID	PCR Express	2003
Centrífuga refrigerada	JOUAN	CR4	2007
Centrífuga refrigerada	HETTICH	Universal 32R	2004
Microcentrífuga refrigerada	EPPENDORF	5415R	2007
Cabina de flux laminar	TELSTAR	BIO-II-A	2004
Cabina de flux laminar	FASTER	Bio 48	2004
Incubador de CO <sub>2</sub>	RS BIOTECH	GALAXY S	2006
Bany maria amb agitació	P SELECTA	Unitronic OR	2004
Microcentrífuga	HETTICH	MIKRO 12-24	2006
Microscopi invertit	ZEISS	Arxiovert40CFL	2006
Bomba de buit		KNF	2004
Transil·luminador	LINUS	Dual power	2004
Càmera digital compacta per microscopi	CANON	PowerShot G5	2006

---

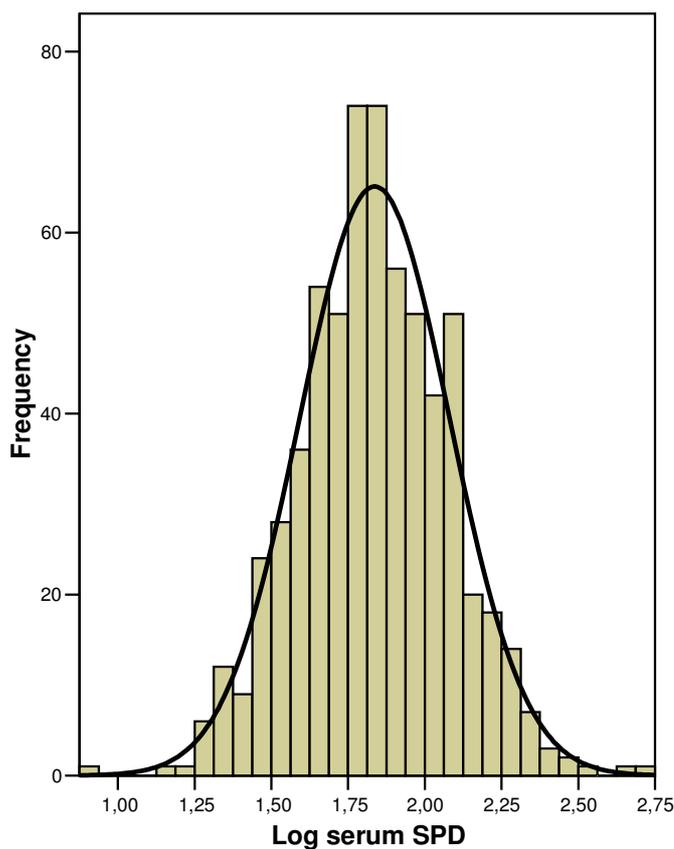
## **4. RESULTATS**



## **4.1. RESULTATS DE LA 1ª PART: L'SP-D**

### **4.1.1. RELACIÓ DE L'SP-D CIRCULANT AMB LA TOLERÀNCIA A LA GLUCOSA I EL FET DE FUMAR**

L'SP-D circulant està desviada cap a la dreta de la població estudiada. L'SP-D sèrica transformada a base logarítmica segueix una corba normal (Figura 4.1.1.) i s'utilitza al llarg de totes les anàlisis.



***Figura 4.1.1.:*** Histograma mostrant una distribució normal de la transformació logarítmica de l'SP-D sèrica en la població estudiada.

Les característiques dels subjectes i la comparació amb els individus DM 2 es mostren a la taula 4.1.1.

**Taula 4.1.1.**

**VARIABLES ANTROPOMÈTRIQUES I BIOQUÍMIQUES DELS SUBJECTES ESTUDIATS.**

	<b>Tolerància Normal a la Glucosa</b>	<b>Intolerància a la Glucosa</b>	<b>Diabetis Tipus 2</b>	<b>ANOVA <i>p</i></b>
<b>n (homes)</b>	204	64	120	-
<b>Fumadors (no/si)</b>	147 / 57	50 / 14	80 / 40	0.41
<b>Edat (anys)</b>	48 ± 11.8	59 ± 9.5	56.8 ± 11.2	<0.0001
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	26.5 ± 3.5	28.2 ± 3.4	29.1 ± 3.9	<0.0001
<b>WHR (índex cintura-maluc)</b>	0.92 ± 0.06	0.95 ± 0.07	1 ± 0.08	<0.0001
<b>Massa lliure de greix (kg)</b>	70.9 ± 8.6	71.6 ± 10.4	-	0.5
<b>Massa de greix (kg)</b>	6.8 (2.3 – 13.4)	9.9 (4.6 – 15.3)	-	0.01
<b>TAS (mm Hg)</b>	123.2 ± 14.4	132 ± 16.1	141.4 ± 20	<0.001
<b>TAD (mm Hg)</b>	77.2 ± 10.5	81.8 ± 9.1	81.4 ± 12.5	0.001
<b>Glucosa en dejú (mmol/l)</b>	5.27 ± 0.5	5.58 ± 0.7	9.12 ± 4	<0.0001
<b>Insulina en dejú (mU/l)</b>	8.6 ± 4.7	11.9 ± 5.8	-	<0.0001
<b>HbA<sub>1c</sub> (%)</b>	4.82 ± 0.47	4.97 ± 0.55	6.8 ± 1.6	<0.0001
<b>Colesterol HDL (mg/dl)</b>	53.3 ± 12.7	50.2 ± 12.3	47.5 ± 12.6	0.001
<b>Triglicèrids (mg/dl)<sup>a</sup></b>	83.5 (59.2 – 117.7)	100.5 (78.5 – 156.5)	178 (121.5 – 283)	<0.0001
<b>S<sub>I</sub><sup>1</sup> (10<sup>-4</sup>*mU/L)<sup>a</sup></b>	2.67 (1.77 – 4.16)	1.29 (0.77 – 2.33)	-	<0.0001
<b>S<sub>G</sub><sup>1,a</sup></b>	0.020 (0.016- 0.023)	0.018 (0.014 – 0.019)	-	0.07
<b>LBP (µg/ml)<sup>a</sup></b>	14.4 (7.9 – 31.1)	11.4 (8.6 – 22.8)	49.2 (35.4 – 66.7)	<0.0001
<b>SP-D (ng/ml)<sup>a</sup></b>	71.9 (50.6 – 107.4)	75.6 (55 – 113.4)	63 (44.6 – 84)	0.001

<sup>a</sup>expressat com a mediana i rang interquartil.

<sup>1</sup>mesurat en 130 subjectes amb tolerància a la glucosa normal i en 60 individus amb intolerància a la glucosa.

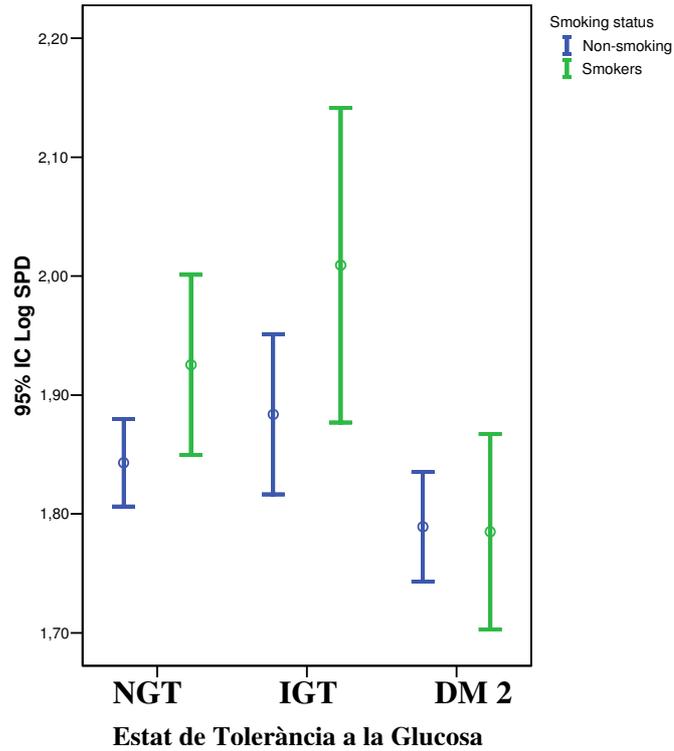
IMC: índex de massa corporal; WHR: índex cintura/maluc; TAS i TAD: tensió arterial sistòlica i diastòlica; OGTT: test oral de tolerància a la glucosa; S<sub>I</sub> i S<sub>G</sub>: sensibilitat a la insulina i efectivitat de la glucosa, respectivament; HbA<sub>1c</sub>: hemoglobina glicada; LBP: proteïna d'unió a lipopolisacàrids; SP-D: proteïna surfactant pulmonar D.

Els subjectes intolerants a la glucosa o amb DM 2 tenen significativament més edat, més pes, i mostren menys sensibilitat a la insulina i efectivitat de la glucosa que els subjectes tolerants a la glucosa.

L'SP-D circulant és significativament inferior en els pacients amb DM 2 (Taula 4.1.1.). Després d'ajustar per l'IMC, l'edat i el fet de fumar, la mitjana de l'SP-D sèrica en base logarítmica és significativament inferior en individus amb DM 2 ( $1.79 \pm 0.15$  (61.6 ng/ml) vs.  $1.91 \pm 0.17$  en subjectes amb intolerància a la glucosa (IGT, 81.2 ng/ml) i  $1.88 \pm 0.13$  en subjectes amb tolerància a la glucosa normal (NGT, 75.8 ng/ml) ( $P=0.005$ ).

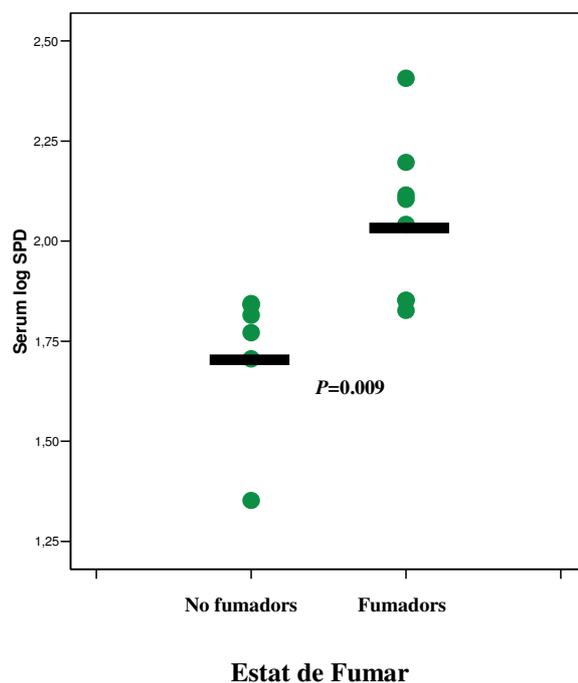
Els subjectes obesos mostren concentracions sèriques de SP-D significativament més baixes (log SP-D  $1.80 \pm 0.20$  vs.  $1.86 \pm 0.24$ ,  $P=0.03$ ).

També s'ha observat una interacció entre l'estat de tolerància a la glucosa i el fet de fumar. Fumadors amb NGT mostren una mitjana de log-SP-D significativament superior ( $1.92 \pm 0.28$  vs.  $1.84 \pm 0.22$ ,  $P=0.03$ ); hi ha una tendència a ser més alta la mitjana de log-SP-D en subjectes IGT ( $2.00 \pm 0.22$  vs.  $1.88 \pm 0.23$ ,  $P=0.08$ ) però no en pacients amb DM 2 ( $1.78 \pm 0.25$  vs.  $1.79 \pm 0.20$ ,  $P=0.92$ ) (Figura 4.1.2.).



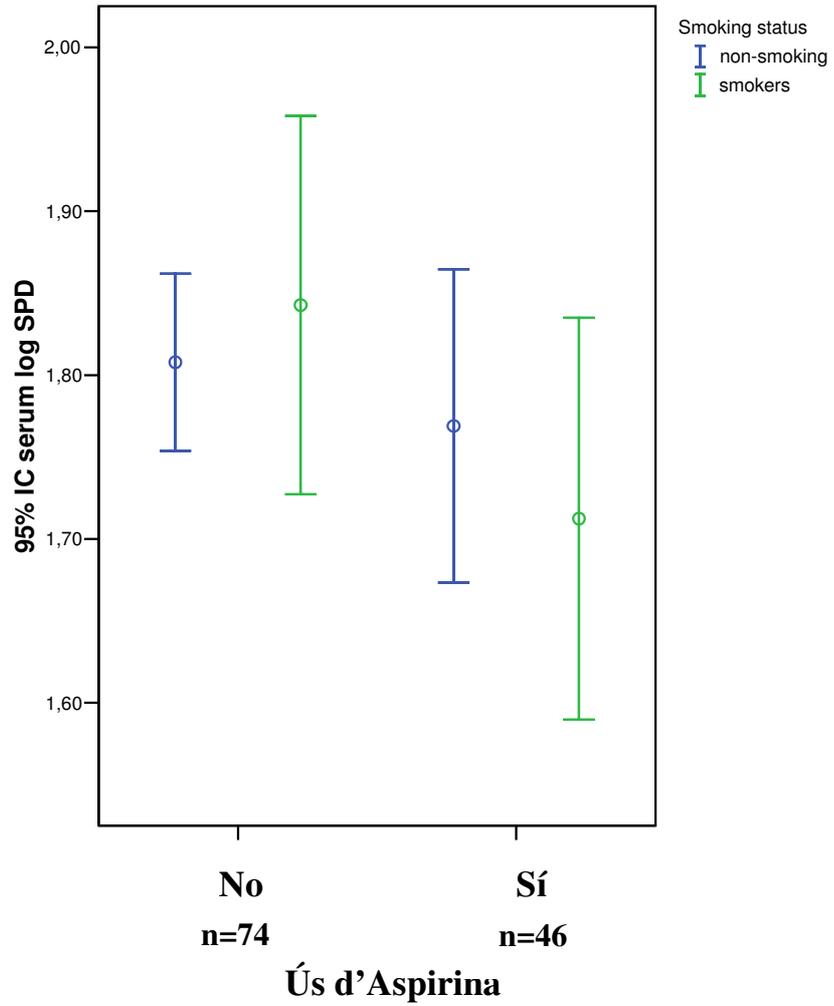
**Figura 4.1.2.:** 95% d'interval de confiança per la mitjana del log de SP-D sèrica d'acord amb l'estat de tolerància a la glucosa i el fet de fumar. NGT: tolerants a la glucosa; IGT: intolerants a la glucosa; DM 2: diabètics tipus 2.

Per comprovar que aquesta interacció no és deguda a l'augment de glucosa sèrica, s'ha avaluat un grup d'homes DM 1 (n=14). Els fumadors amb DM 1 (n=8) tenen la mitjana del log-SP-D significativament més elevada que els no fumadors (n=6) ( $2.04 \pm 0.20$  vs.  $1.72 \pm 0.19$ ),  $P=0.009$  (Figura 4.1.3.) (els fumadors i els no fumadors són d'edats similars ( $35 \pm 10$  vs.  $38.8 \pm 13$  anys,  $P=0.5$ ) i d'IMC similars, també ( $23.6 \pm 3.9$  vs.  $23.5 \pm 3$ ,  $P=0.9$ )).



***Figura 4.1.3.*** Log SP-D sèrica en pacients DM 1 d'acord amb l'estat de fumar.

La concentració de SP-D sèrica no és diferent entre pacients amb DM 2 tractats amb estatines, fibrats, insulina, agents hipoglucèmics, agents per la disminució de la pressió sanguínia o al·lopurinol vs. pacients que no prenen fàrmacs. S'observa que els pacients que reben aspirina (n=46) mostren una tendència cap a la disminució de la concentració sèrica de SP-D ( $1.74 \pm 0.23$  vs.  $1.81 \pm 0.20$ ,  $P=0.08$ ), tenint en compte que tenen edats similars ( $58.3 \pm 8.7$  vs.  $56.5 \pm 11.8$ ,  $P=0.4$ ) i IMC similar ( $29.7 \pm 4.1$  vs.  $28.9 \pm 3.7$ ,  $P=0.3$ ) (Figura 4.1.4.).



**Figura 4.1.4.:** Interval de confiança per la mitjana del log SP-D sèrica d'acord amb l'ús d'aspirina i l'estat de fumar en pacients DM 2.

**4.1.2. RELACIÓ DE L'SP-D AMB VARIABLES DEL METABOLISME DE LA GLUCOSA I LA INFLAMACIÓ.**

En tots els subjectes en general, l'SP-D circulant està correlacionada significativament amb la concentració sèrica de glucosa als 60' després de l'OGTT, amb l'LBP, amb el TNFR2 i amb la sensibilitat a la insulina (Taula 4.1.2.).

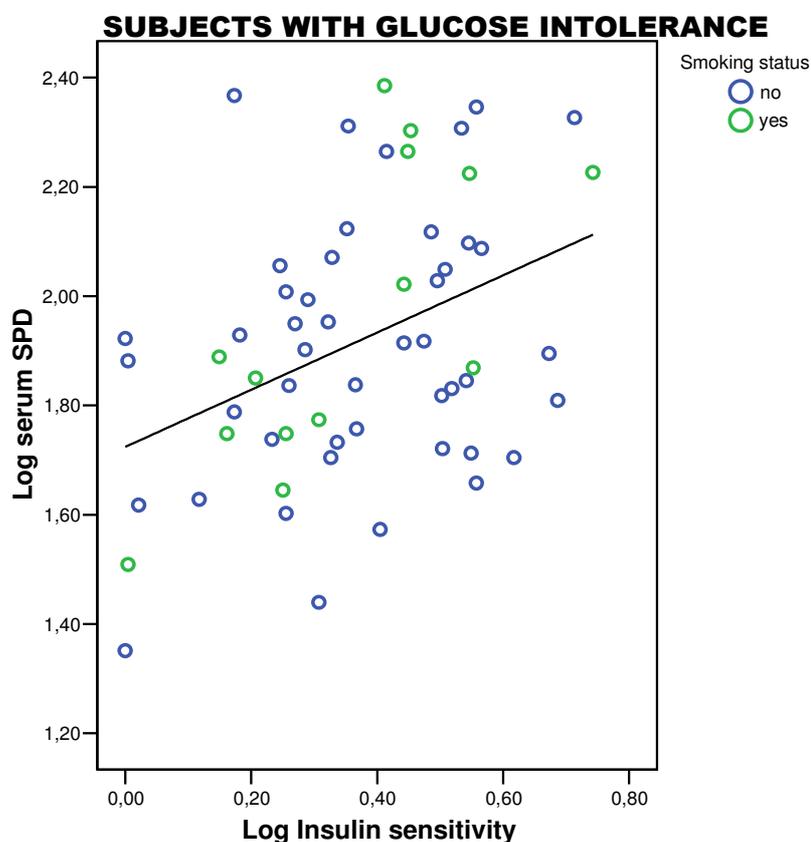
**Taula 4.1.2.**

**CORRELACIÓ ENTRE L'SP-D CIRCULANT I VARIABLES BIOQUÍMIQUES.**

	Tots els subjectes (N=230)	P	Subjectes Normotolerants (N=130)	P	Subjectes Intolerants (N=100)	P
Glucosa en dejú	<b>-0.15</b>	<b>0.02</b>	-0.08	0.3	<b>-0.27</b>	<b>0.007</b>
Glucosa 30' OGTT	-0.10	0.1	0.01	0.8	<b>-0.29</b>	<b>0.004</b>
Glucosa 60' OGTT	<b>-0.17</b>	<b>0.01</b>	-0.10	0.2	<b>-0.34</b>	<b>0.001</b>
Glucosa 90' OGTT	-0.06	0.3	-0.02	0.8	-0.17	0.08
Glucosa 120' OGTT	-0.07	0.2	-0.07	0.4	-0.17	0.08
HbA1c	-0.10	0.1	0.07	0.3	<b>-0.23</b>	<b>0.02</b>
Insulina en dejú	-0.09	0.1	-0.11	0.2	-0.06	0.5
Insulina 120' OGTT	-0.09	0.1	-0.03	0.6	-0.13	0.1
Triglicèrids	-0.11	0.09	-0.03	0.6	<b>-0.36</b>	<b>&lt;0.0001</b>
Colesterol HDL	0.04	0.4	-0.05	0.4	<b>0.21</b>	<b>0.03</b>
S <sub>I</sub>	<b>0.17</b>	<b>0.03</b>	0.12	0.2	<b>0.40</b>	<b>0.002</b>
S <sub>G</sub>	-0.05	0.4	0.02	0.8	<b>0.16</b>	<b>0.02</b>
sTNFR1	0.06	0.3	-0.02	0.8	0.15	0.1
sTNFR2	<b>0.17</b>	<b>0.01</b>	0.07	0.3	<b>0.28</b>	<b>0.006</b>
LBP	<b>-0.19</b>	<b>0.005</b>	-0.13	0.07	-0.19	0.06

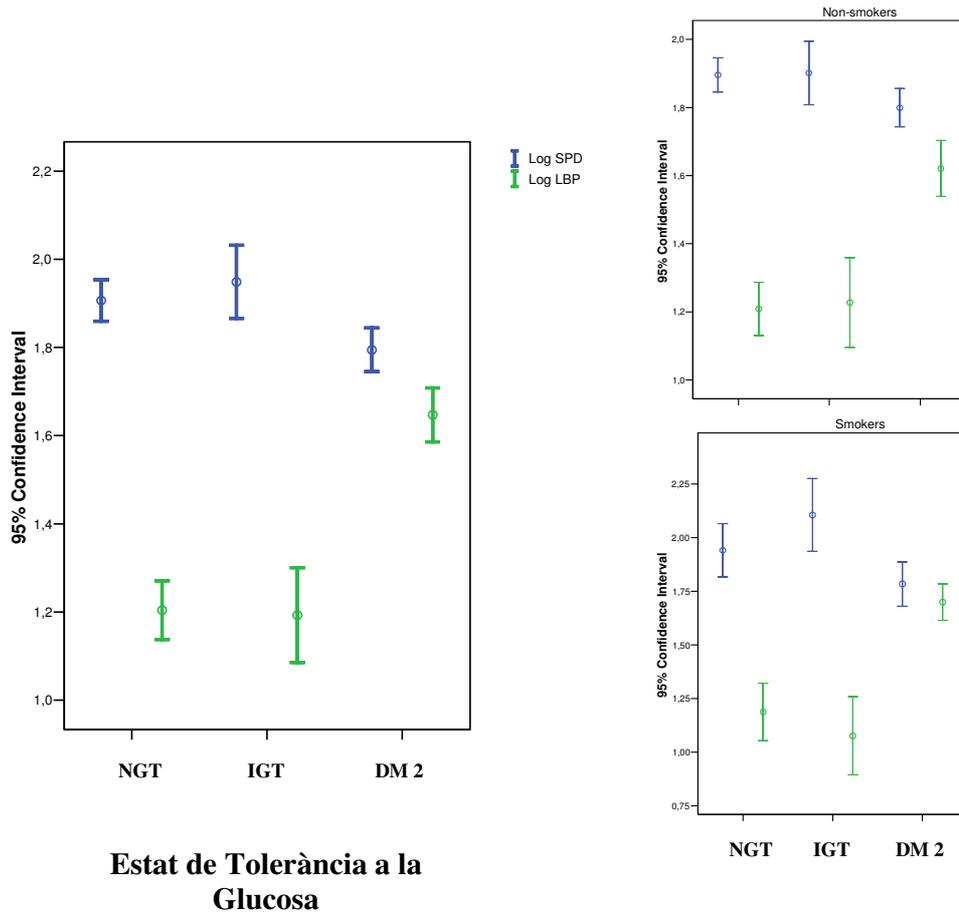
OGTT: test oral de tolerància a la glucosa; 30', 60', 90' i 120' indica els minuts després de la presa (dosi) de glucosa; sTNFR1, sTNFR2: fracció soluble del receptor 1 i 2 del factor de necrosi tumoral  $\alpha$ , respectivament; S<sub>I</sub>: sensibilitat a la insulina; S<sub>G</sub>: efectivitat de la glucosa. LBP: proteïna d'unió a lipopolisacàrids.

En subjectes amb intolerància a la glucosa, aquestes associacions són més consolidades. En aquest subgrup, també s'han observat associacions significatives amb l'HbA<sub>1C</sub>, els triglicèrids en dejú, el colesterol HDL i l'efectivitat de la glucosa ( $S_G$ ). L'associació entre l'SP-D i la sensibilitat a la insulina és més significativa en subjectes amb intolerància a la glucosa ( $r=0.40$ ,  $P=0.002$ ; Figura 4.1.5.).



**Figura 4.1.5.:** Associació lineal entre l'SP-D sèrica i la sensibilitat a la insulina en subjectes intolerants a la glucosa.

L'SP-D circulant es troba en proporció inversa a l'LBP sèrica (els pacients amb DM 2 mostren una concentració de LBP sèrica més gran i una concentració de SP-D més baixa tant en fumadors com en no fumadors) (Figura 4.1.6.).



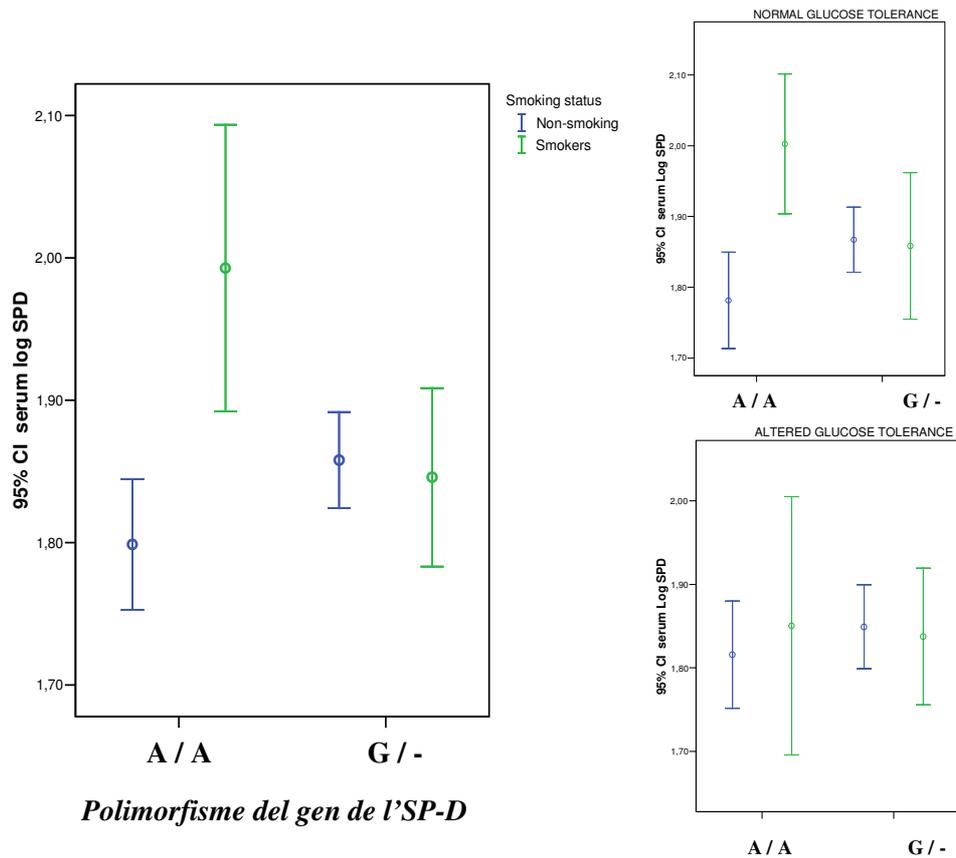
**Figura 4.1.6.:** 95% d'interval de confiança per la mitjana del log SP-D i log LBP d'acord amb l'estat de tolerància a la glucosa i del fet de fumar. LBP: proteïna d'unió a lipopolisacàrids; NGT: tolerants a la glucosa; IGT: intolerants a la glucosa; DM 2: diabètics tipus 2.

S'ha realitzat una anàlisi de regressió lineal múltiple per predir l'SP-D circulant. S'ha considerat com a variables independents aquelles amb associació significativa en

l'anàlisi univariant. Quan es consideren tots els subjectes en general, només l'edat ( $P=0.01$ ) i la glucosa en dejú ( $P=0.001$ ) contribueixen independentment al 11% de la variància de SP-D (4% i 7% respectivament), després de controlar els efectes de l'edat, l'IMC, el fet de fumar, els triglicèrids en dejú, l'LBP i la sensibilitat a la insulina. Quan l'anàlisi es realitza en subjectes amb intolerància a la glucosa, només la glucosa en dejú ( $P<0.0001$ ,  $r \text{ square}=0.18$ ) i els triglicèrids en dejú ( $P=0.001$ ,  $r \text{ square}=0.15$ ) contribueixen independentment al 33% de la variància de SP-D.

#### **4.1.3. RELACIÓ ENTRE EL POLIMORFISME DEL GEN DE L'SP-D I LES VARIABLES METABÒLIQUES**

Donat que hi ha una associació entre l'SP-D circulant i algunes variables metabòliques, s'ha estudiat un polimorfisme del gen de l'SP-D que se sap d'entrada que influeix en la concentració circulat de l'SP-D. S'ha observat una interacció entre aquest polimorfisme i el fet de fumar. Subjectes que són fumadors i homozigots per A/A mostren una concentració sèrica de SP-D significativament més elevada que els no fumadors, ajustat per edat i IMC ( $P=0.001$ , Figura 4.1.7.).

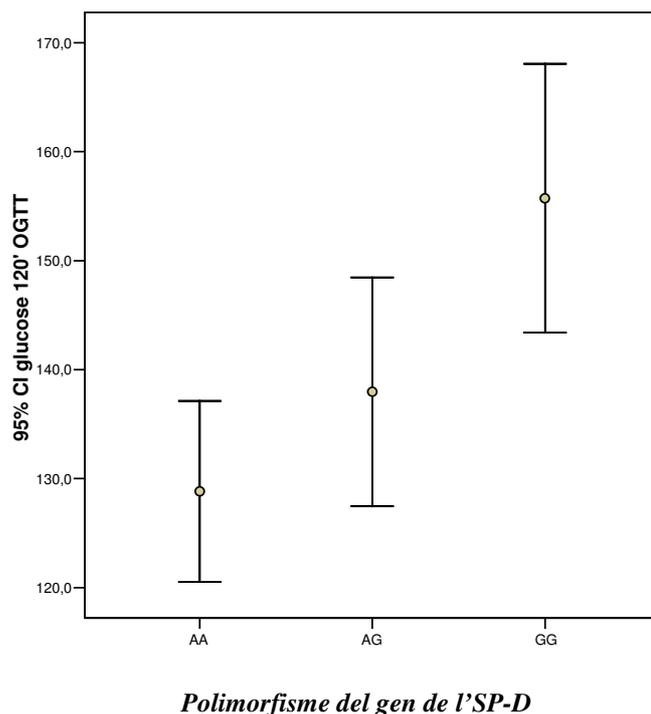


**Figura 4.1.7.:** Interval de confiança per la mitjana del log-SP-D sèrica d'acord amb el polimorfisme Met<sup>11</sup>Thr del gen de l'SP-D estudiat, l'estat de tolerància a la glucosa (gràfica de la dreta) i l'estat de fumar.

Per contra, els fumadors amb G/- tenen concentracions sèriques de SP-D no significativament diferents als no fumadors. Altra vegada, les diferències en l'SP-D es mantenen en subjectes amb tolerància normal a la glucosa, però no en individus intolerants a la glucosa (Figura 4.1.7.).

En una mostra de 230 subjectes, els homozigots GG mostren significativament més concentració de glucosa sèrica en dejú i després de l'OGTT i més insulina en dejú, ajustant per l'IMC, el fet de fumar i l'edat. S'ha vist un efecte dosi-gen després de la

presa d'un bolus de glucosa on es suggereix que: els homozigots *GG* mostren més concentració en sang de glucosa al minut 120' de l'OGTT que els heterozigots *G/A* i els homozigots *A/A* (Figura 4.1.8.).



***Figura 4.1.8.***: Interval de confiança per la mitjana de la glucosa sèrica 2 hores després del test oral de tolerància a la glucosa d'acord amb el polimorfisme Met<sup>11</sup>Thr del gen de l'SP-D.

També s'ha observat una tendència cap a l'augment dels triglicèrids en dejú i una disminució del colesterol HDL en els homozigots per *GG* (Taula 4.1.3.).

**Taula 4.1.3.**

**POLIMORFISME Met<sup>11</sup>Thr DEL GEN DE L'SP-D I VARIABLES METABÒLIQUES.**

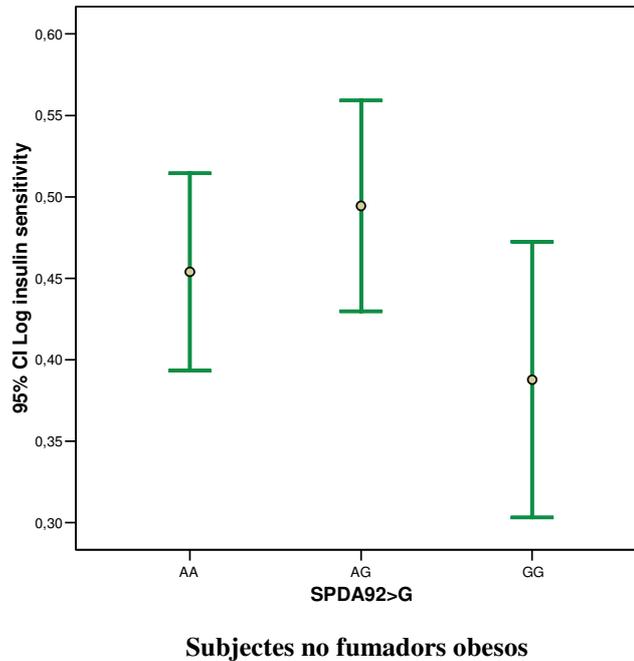
	Subjectes A/-	Subjectes GG	P
Homes (n)	180	50	-
Normotolerants/Intolerants a la Glucosa	<b>121 / 59</b>	<b>23 / 27</b>	<b>0.01</b>
No Fumadors/Fumadors	125 / 55	44 / 6	0.6
Edat (anys)	51.8 ± 12	54.1 ± 11.4	0.2
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	27.1 ± 3.8	27.4 ± 3.8	0.5
WHR	0.93 ± 0.07	0.93 ± 0.06	0.7
Massa lliure de greix (kg)	71.1 ± 10.2	73.1 ± 10.2	0.2
Massa de greix (kg)	6.9 (2.2 - 14.6)	7.0 (2 - 16.1)	0.4
TAS (mm Hg)	126 ± 15	125.1 ± 17.7	0.7
TAD (mm Hg)	78.4 ± 10.1	79.08 ± 11.1	0.6
Glucosa en dejú (mmol/l)	5.46 ± 0.68	5.46 ± 0.52	0.9
Glucosa 120' OGTT (mmol/l)	<b>7.37 ± 2.39</b>	<b>8.57 ± 2.54</b>	<b>0.004</b>
Insulina en dejú (mU/l)	<b>9.3 ± 5.4</b>	<b>12.2 ± 7.8</b>	<b>0.02</b>
Insulina 90' OGTT (mU/l)	<b>89.3 ± 59.4</b>	<b>114.4 ± 75.1</b>	<b>0.04</b>
Insulina 120' OGTT (mU/l)	<b>71 (28.4 - 87)</b>	<b>96.5 (28.9 - 102.7)</b>	<b>0.02</b>
HbA <sub>1C</sub> (%)	4.89 ± 0.48	4.91 ± 0.48	0.7
Colesterol HDL	53.6 ± 12.8	49.3 ± 12.3	0.07
Triglicèrids (mg/dl) <sup>a</sup>	107 (71 - 181.2)	117 (81 - 223)	0.09
S <sub>I</sub> (min <sup>-1</sup> ·mIU/L·10 <sup>-4</sup> ) <sup>a</sup>	2.32 (1.2 - 3.27)	2.05 (1.06 - 3.1)	0.2
S <sub>G</sub> <sup>a</sup> (min <sup>-1</sup> )	0.019 (0.016 - 0.023)	0.018 (0.015 - 0.020)	0.1
Log SP-D sèrica (ng/ml)	1.89 ± 0.24	1.87 ± 0.21	0.6
LBP (µg/ml) <sup>a</sup>	25.9 (11 - 50.9)	29.9 (9.9 ± 50.1)	0.1

<sup>a</sup>expressat com a mediana i rang interquartil

120' i 90': indica els minuts després de la presa (dosi) de glucosa en l'OGTT: test oral de tolerància a la glucosa; IMC: índex de massa corporal; WHR: índex cintura-maluc; TAS: tensió arterial sistòlica; TAD: tensió arterial diastòlica; HbA<sub>1C</sub>: hemoglobina glicada; S<sub>I</sub>: sensibilitat a la insulina; S<sub>G</sub>: efectivitat de la glucosa; Log SP-D: logaritme de la proteïna del surfactant pulmonar D; LBP: proteïna d'unió a lipopolisacàrids.

També s'han trobat diferències no significatives en la sensibilitat a la insulina. No obstant, després d'estratificar l'IMC, els subjectes obesos i amb sobrepès no fumadors

( $IMC > 25 \text{ kg/m}^2$ ) mostren una disminució significativa de la sensibilitat a la insulina ( $\log S_I \text{ } 0.38 \pm 0.19 \text{ vs. } 0.48 \pm 0.18 \text{ } 10^{-4} * \text{ min}^{-1} * \text{ mU/L}$ ,  $P=0.05$ ) (Figura 4.1.9.).



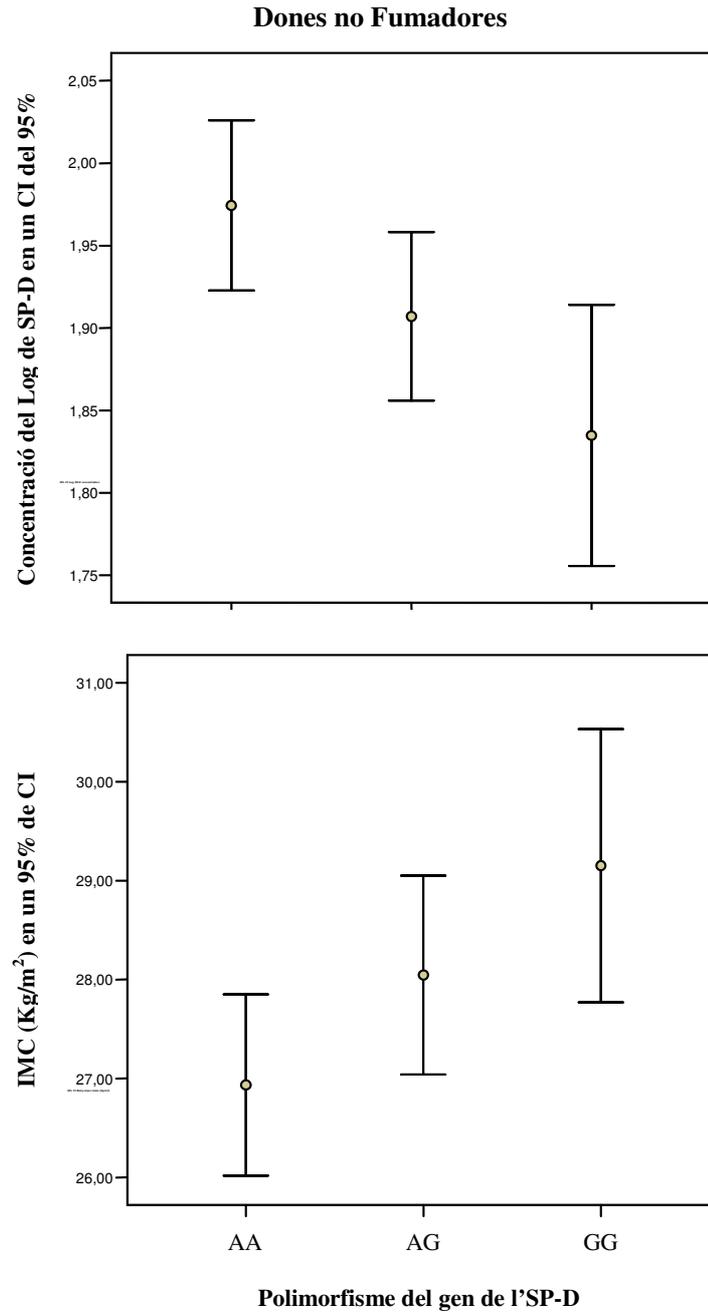
**Figura 4.1.9.:** Interval de confiança per la mitjana de la sensibilitat a la insulina d'acord amb el polimorfisme Met<sup>11</sup>Thr del gen de l'SP-D en subjectes no fumadors obesos i amb sobrepès.

#### **4.1.4. REPLICACIÓ DE L'ESTUDI**

L'SP-D s'ha avaluat en 333 subjectes (població caucasiana d'Astúries, 137 homes) presumptament no diabètics tipus 2, amb mitjana d'edat  $50.7 \pm 7.6$  anys, IMC de  $27.6 \pm 4.6 \text{ kg/m}^2$  dels quals es disposava de plasma. Aquests individus són significativament més joves que el conjunt global de participants de l'estudi ( $P=0.03$ ),

però, per altra banda, són de gènere, IMC i valors de glucosa en dejú similars. En aquests individus, l'SP-D circulant està negativament associada a l'IMC ( $r = -0.19$ ,  $P = 0.001$ ), a la tensió arterial ( $r = -0.13$ ,  $P = 0.01$ ) i a la glucosa en dejú ( $r = -0.14$ ,  $P = 0.009$ ). Aquests resultats són especialment significatius en els individus no fumadors ( $n = 254$ ), en els quals l'SP-D està negativament associada a l'IMC ( $r = -0.14$ ,  $P = 0.02$ ), a la tensió arterial ( $r = -0.13$ ,  $P = 0.03$ ), a les concentracions de glucosa en dejú i després de l'OGTT ( $r = -0.16$ ,  $P = 0.009$  i  $r = -0.13$ ,  $P = 0.04$ , respectivament). En les dones no fumadores ( $n = 157$ ), l'associació més significativa s'observa entre l'SP-D circulant i les concentracions de glucosa després de l'OGTT ( $r = -0.21$ ,  $P = 0.008$ ); i en els homes no fumadors ( $n = 97$ ), l'associació més significativa s'observa entre l'SP-D circulant i la tensió arterial ( $r = -0.33$ ,  $P = 0.001$ ). En els fumadors habituals ( $n = 79$ ), només persisteix l'associació entre l'SP-D circulant i l'IMC ( $r = -0.27$ ,  $P = 0.015$ ).

El polimorfisme Met<sup>11</sup>Thr (92A>G) de l'SP-D s'ha avaluat en 349 dones i 276 homes d'aquest grup de població asturiana. De manera interessant, l'SP-D plasmàtica i l'IMC corren en paral·lel d'acord amb aquest polimorfisme. Aquests resultats són especialment significatius en les dones no fumadores ( $n = 239$ , després d'excloure les dones que habitualment fumen i les exfumadores): les homozigotes GG (per l'SNP Met<sup>11</sup>Thr) mostren una concentració de SP-D significativament més baixa i un IMC més elevat que les homozigotes AA (Figura 4.1.10. i Taula 4.1.4.).



***Figura 4.1.10.*** Interval de confiança per la mitjana de la concentració circulant de SP-D i la mitjana de l'IMC d'acord amb el polimorfisme Met<sup>11</sup>Thr del gen de l'SP-D en la replicació de l'estudi. IMC: índex de massa corporal; SP-D: proteïna surfactant D.

El polimorfisme Met<sup>11</sup>Thr de l'SP-D no comporta diferències significatives en el pes corporal en homes no fumadors però les diferències en les concentracions de l'SP-D circulant van en paral·lel amb la resistència a la insulina (Taula 4.1.4.).

**Taula 4.1.4.**

**POLIMORFISME Met<sup>11</sup>Thr DEL GEN DE L'SP-D EN LA REPLICACIÓ DE L'ESTUDI.**

	AA	GA	GG	P
<b><i>Dones</i></b>				
Edat	59.7 ± 12.7	59 ± 12	61.8 ± 11.7	0.4
IMC	26.9 ± 4.3	28 ± 5.1	29.1 ± 4.7	0.03 <sup>a</sup>
Log SP-D	1.97 ± 0.21	1.90 ± 0.23	1.83 ± 0.25	0.01 <sup>b</sup>
<b><i>Homes</i></b>				
IMC	27.7 ± 4.2	27.7 ± 3.5	29.2 ± 4.9	0.4
Insulina en dejú	7.5 ± 3.7	7.3 ± 4.6	11.2 ± 5.8	0.03 <sup>c,d</sup>
HOMA	1.74 ± 0.9	1.75 ± 1.2	2.64 ± 1.3	0.03 <sup>e</sup>
Log SP-D	2.02 ± 0.21	1.89 ± 0.29	1.77 ± 0.35	0.009 <sup>f</sup>

IMC: índex de massa corporal; SP-D: proteïna surfactant D; HOMA: avaluació amb el model homeostàtic (*homeostasis model assessment*)

<sup>a</sup>post-hoc Sheffé test  $P=0.03$  (AA vs. GG)

<sup>b</sup>post-hoc Sheffé test  $P=0.011$  (AA vs. GG)

<sup>c</sup>post-hoc Sheffé test  $P=0.03$  (AA vs. GG)

<sup>d</sup>post-hoc Sheffé test  $P=0.02$  (GA vs. GG)

<sup>e</sup>post-hoc Sheffé test  $P=0.04$  (AA vs. GG)

<sup>f</sup>post-hoc Sheffé test  $P=0.009$  (AA vs. GG)

**4.1.5. EFECTES DEL SALICILAT EN L'SP-D CIRCULANT**

Després d'observar que l'SP-D sèrica està correlacionada positivament amb el TNFR2 circulant i que l'SP-D augmenta després d'un estímul inflamatori (com el fet de fumar) en els homozigots AA, s'ha volgut avaluar el comportament de l'SP-D en sèrum després

d'un tractament amb un fàrmac antiinflamatori (el trifusal: *4-trifluoromethyl derivative of salicylate*). Donat que la concentració de SP-D és inferior en subjectes obesos, s'ha fet un estudi clínic amb 28 subjectes obesos no fumadors (12 homozigots AA i 16 G/- (3 homozigots)). D'acord amb l'efecte del salicilat de disminuir la concentració de glucosa, la glucosa en dejú disminueix significativament en els homozigots AA però no en els G/- (Taula 4.1.5. i Figura 4.1.11.).

**Taula 4.1.5.**

**ESTUDI DELS EFECTES DEL SALICILAT SOBRE L'SP-D CIRCULANT EN SUBJECTES OBESOS.**

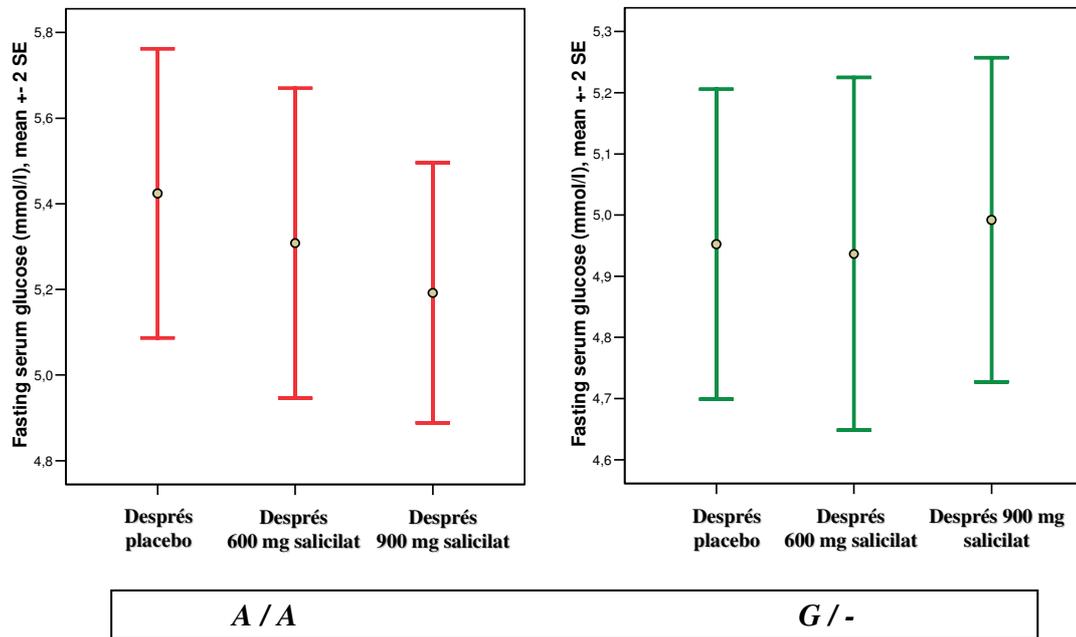
	Homozigots A/A				G / -			
	Després del placebo	salicilat 600 mg	salicilat 900 mg	p <sup>(1)</sup>	Després del placebo	salicilat 600 mg	salicilat 900 mg	p <sup>(1)</sup>
<b>Sexe (M/F)</b>	4/8	-	-		5/11	-	-	
<b>Edat (anys)</b>	47.1 ± 11.2	-	-		49.4 ± 9.8	-	-	0.5*
<b>IMC (Kg/m<sup>2</sup>)</b>	34.2 ± 3.7	34.1 ± 3.5	34.1 ± 3.6	0.3	34 ± 3.5	33.9 ± 3.5	33.9 ± 3.5	0.7
<b>Glucosa en dejú (mmol/l)</b>	5.50 ± 0.59	5.37 ± 0.61	5.19 ± 0.50	0.02	4.95 ± 0.47	4.93 ± 0.53	4.99 ± 0.49	0.7
<b>log SP-D sèrica (ng/ml)</b>	1.94 ± 0.22	1.90 ± 0.24	1.89 ± 0.25	0.02	1.90 ± 0.34	1.89 ± 0.34	1.91 ± 0.35	0.5

Dades com a mitjana ± SD.

<sup>(1)</sup> per la comparació entre 900 mg de salicilat i el placebo.

\* entre els homozigots A/A i els G/-.

IMC: índex de massa corporal; SP-D: proteïna surfactant D.

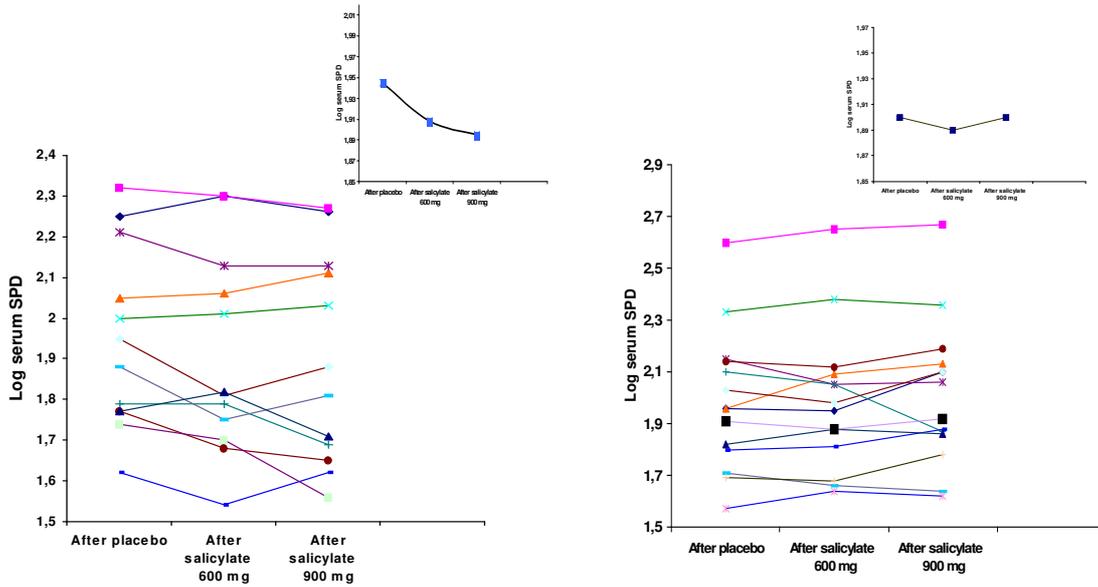


*Polimorfisme del gen de l'SP-D*

**Figura 4.1.11.:** Estudi dels efectes del salicilat en un 95% d'interval de confiança de la mitjana de la glucosa sèrica en dejú d'acord amb el polimorfisme Met<sup>11</sup>Thr del gen de l'SP-D.

Paral·lelament, l'SP-D circulant està significativament disminuïda en els homozigots AA però no en els G/- (Figura 4.1.12.).

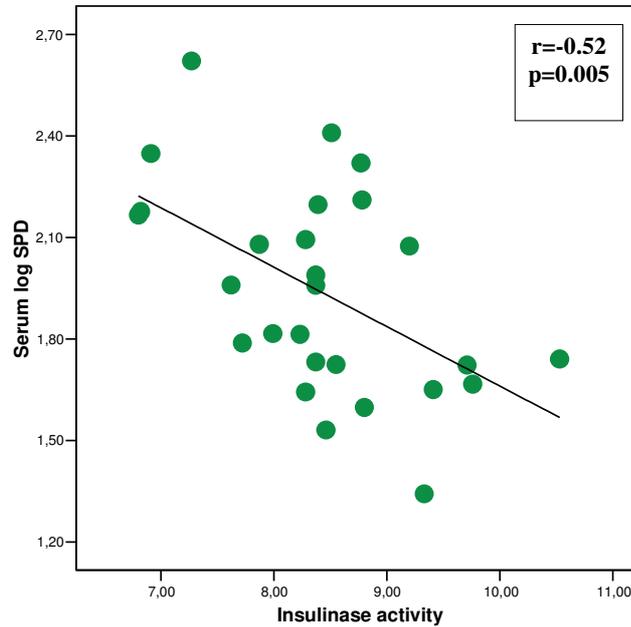
<b>A/A</b>	<b>G/-</b>
------------	------------



**Figura 4.1.12.:** Estudi dels efectes del salicilat sobre l'SP-D sèrica d'acord amb el polimorfisme

Met<sup>11</sup>Thr de l'SP-D. Es mostra la mitjana dels valors.

Per avaluar els possibles mecanismes que hi ha darrera l'associació entre l'SP-D i el metabolisme de la glucosa s'estudia l'activitat basal de la insulina de les mostres dels subjectes tractats amb salicilats. Com que l'SP-D és molt sensible a les proteases, s'estudia l'activitat insulina del plasma. S'observa que l'SP-D circulant i l'activitat insulina estan altament correlacionades (Figura 4.1.13.).



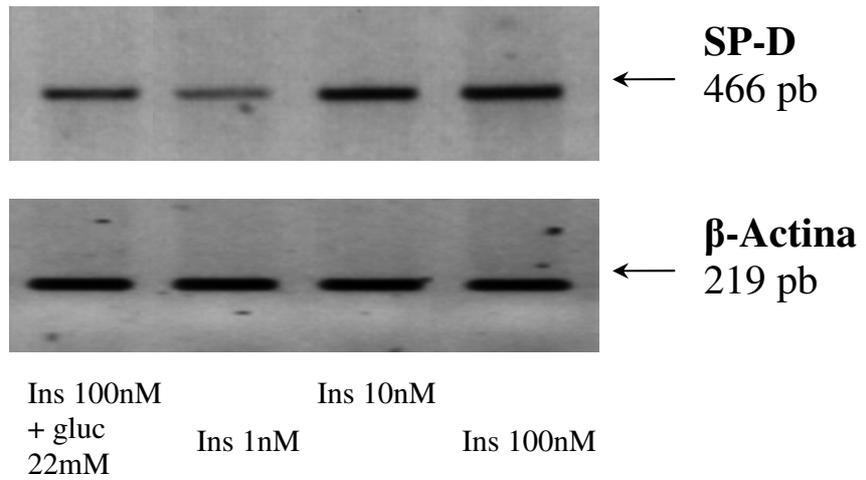
S'ha exclòs un subjecte amb concentració de SP-D molt baixa i activitat insulina molt elevada; si s'inclou aquest subjecte, fins i tot, millora la relació:  $r = -0.56$ ,  $P = 0.002$ .

***Figura 4.1.13.***: Associació lineal entre l'SP-D sèrica i l'activitat insulina en subjectes obesos.

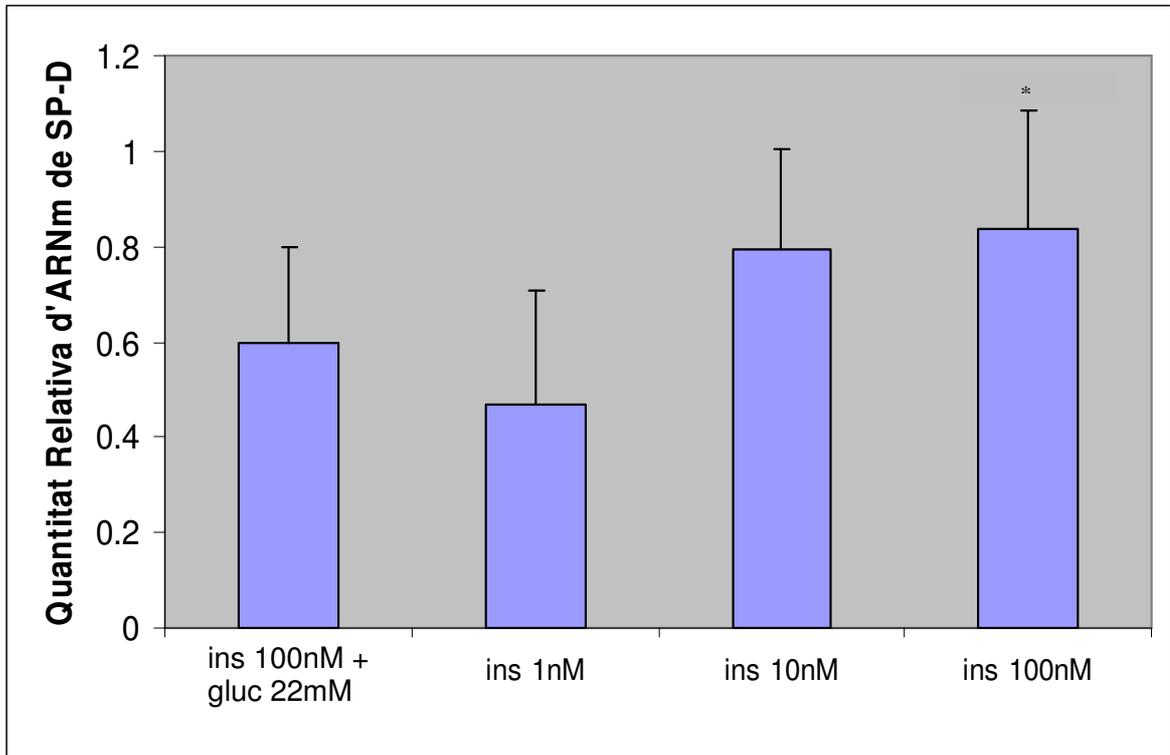
#### **4.1.6. ESTUDI *IN VITRO***

La incubació de cèl·lules que expressen SP-D amb 100nM d'insulina durant 24 hores causa un augment significatiu de les concentracions d'ARNm de SP-D comparat amb la incubació feta d'insulina combinada amb glucosa (100nM d'insulina i 22mM de glucosa) ( $p = 0.03$ , test de Student per mostres aparellades) (Figura 4.1.14. A i B).

A



B



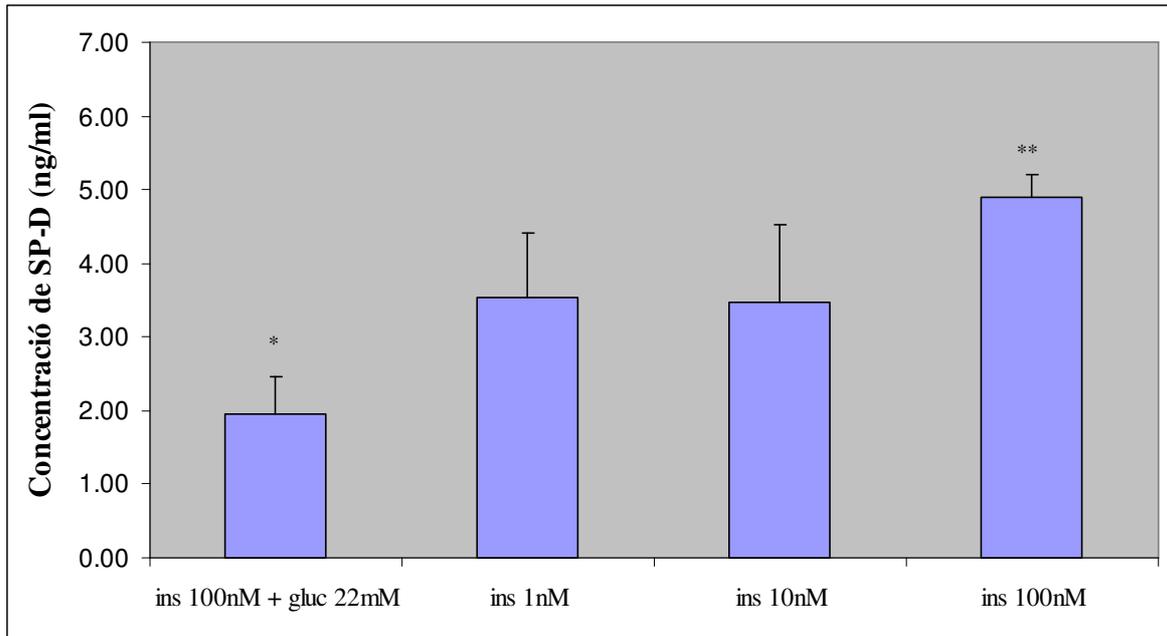
**Figura 4.1.14.:** Efecte de la insulina i la combinació d'insulina + glucosa en la concentració d'ARNm

de l'SP-D en cèl·lules A549. A: autoradiograma representatiu de la PCR de l'SP-D. S'ha carregat la mateixa quantitat d'ADNc a cada pou per cada una de les condicions. La β-actina s'ha utilitzat com a estàndard o control. B: dades densitomètriques, procedents de triplicats del mateix cultiu (o mateixes

condicions) després de normalitzar per la  $\beta$ -actina. Les dades són la mitjana  $\pm$  SE. \* significativament diferent del tractament amb 100nM d'insulina + 22mM de glucosa ( $P=0.03$ , test Student per mostres aparellades). Ins: Insulina; Gluc: glucosa.

---

Aquests resultats s'han confirmat mitjançant la mesura de la concentració de l'SP-D en aquestes condicions de cultiu cel·lular descrites. La combinació dels tractaments amb 100 nM d'insulina i 22 mM de glucosa durant 24h causa una inhibició significativa de la secreció de SP-D si es compara amb el control ( $P=0.03$ , test de Student per mostres aparellades) (Figura 4.1.15.). Per contra, quan les cèl·lules només són tractades amb 100 mM d'insulina s'observa una estimulació significativa de la secreció de SP-D comparat amb el tractament combinat anterior ( $P=0.004$ , test de Student per mostres aparellades) (Figura 4.1.15.).

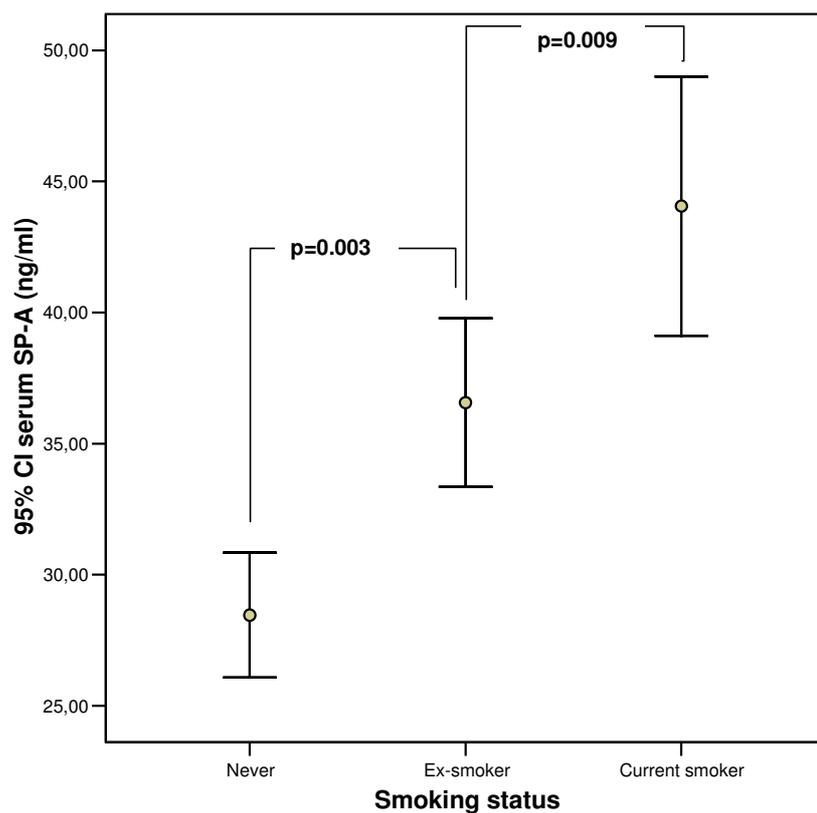


**Figura 4.1.15.:** Efectes de la insulina i la combinació d'insulina + glucosa en la secreció de SP-D en cèl·lules A549. Les dades són la mitjana  $\pm$  SE. \* diferències significatives respecte el control ( $P=0.03$ , test de Student per mostres aparellades). \*\* significativament diferent del tractament amb 100 nM d'insulina + 22 mM de glucosa ( $P=0.004$ , test de Student per mostres aparellades). Ins: insulina; Gluc: glucosa.

## **4.2. RESULTATS DE LA 2<sup>a</sup> PART: L'SP-A**

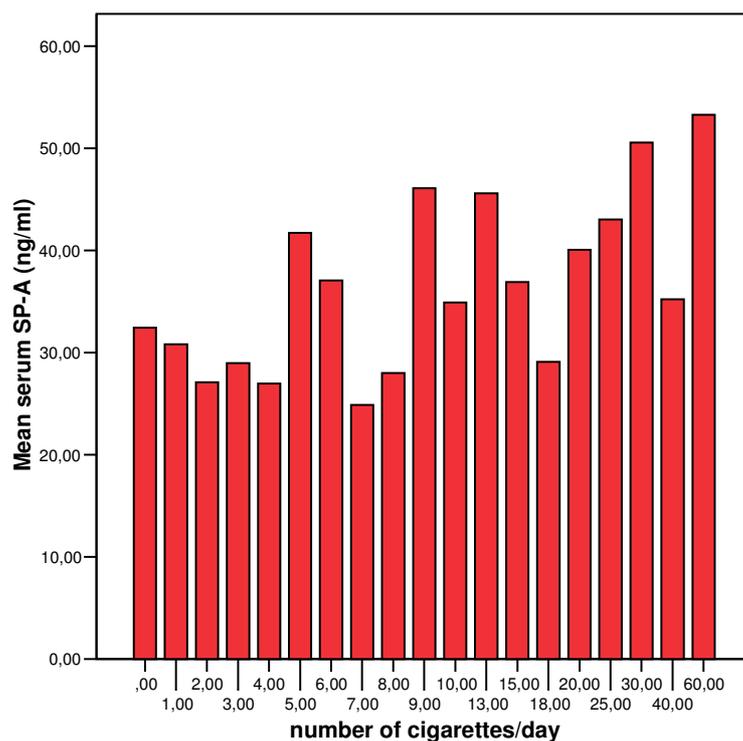
### **4.2.1. RELACIÓ DE L'SP-A CIRCULANT I EL FET DE FUMAR**

Els subjectes fumadors (n=75) tenen concentracions de SP-A significativament més altes que els exfumadors; i aquests últims (n=84) tenen al seu torn concentracions de SP-A significativament més altes que els individus que mai han fumat (n=80) (Figura 4.2.1.).



***Figura 4.2.1.*** 95% d'interval de confiança per la mitjana de la concentració sèrica de SP-A d'acord amb el fet de fumar.

De fet, les concentracions sèriques de SP-A es correlacionen significativament amb el número de cigarretes diàries que es fuma un pacient (Figura 4.2.2.).



**Figura 4.2.2.:** 95% d'interval de confiança per la mitjana de la concentració sèrica de SP-A d'acord amb el número de cigarretes fumades en un dia. La correlació entre aquests dos factors és altament significativa ( $r= 0.31$ ,  $p<0.0001$ ).

Com s'ha comentat a la introducció, l'SP-A sèrica reflecteix el dany pulmonar ocasionat pel fet de fumar.

Per excloure la variabilitat ocasionada per l'exposició al tabac s'han exclòs els subjectes fumadors en les següents anàlisis.

**4.2.2. RELACIÓ DE L'SP-A AMB VARIABLES DEL METABOLISME DE LA GLUCOSA I LA INFLAMACIÓ**

Les característiques dels subjectes no fumadors segons l'estat de tolerància a la glucosa es mostren a la Taula 4.2.1.

**Taula 4.2.1.**

**VARIABLES ANTROPOMÈTRIQUES I BIOQUÍMIQUES DELS SUBJECTES NO FUMADORS ESTUDIATS.**

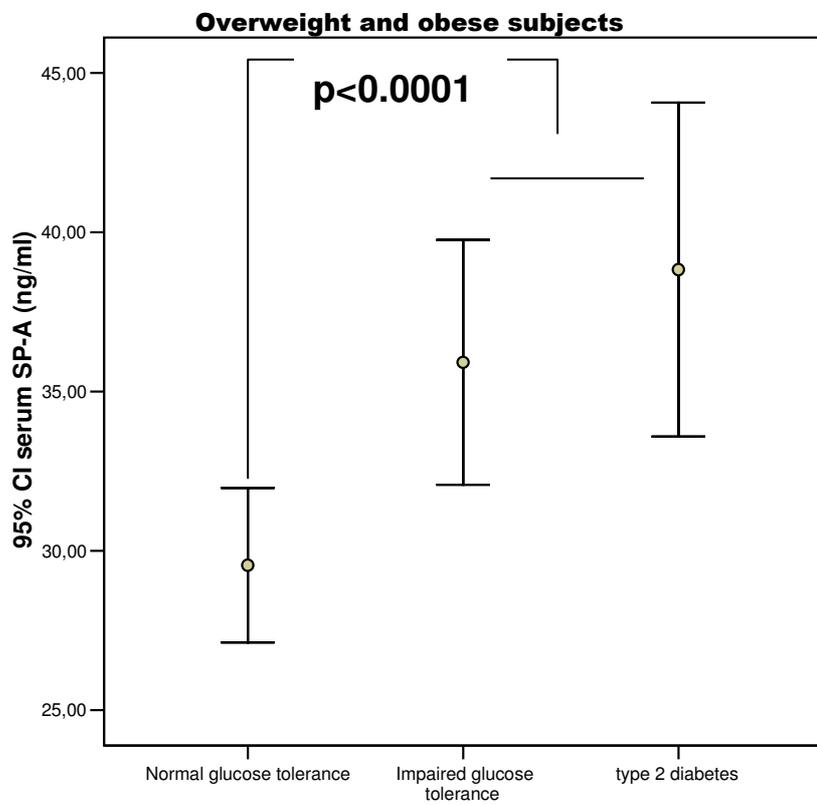
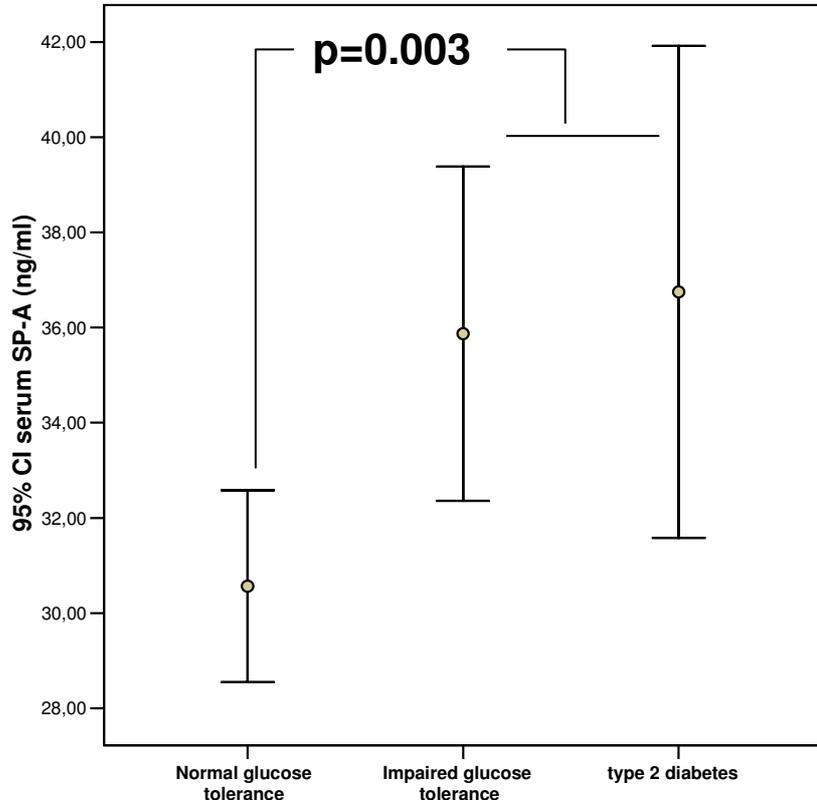
	<b>Tolerància Normal a la Glucosa</b>	<b>Intolerància a la Glucosa en Dejú</b>	<b>Intolerància a la Glucosa</b>	<b>Diabetis Tipus 2</b>	<b>ANOVA <i>p</i></b>
<b>n (homes)</b>	92	11	37	24	-
<b>Edat (anys)</b>	48.8 ± 11.9	47.6 ± 10.2	58.3 ± 10.1	58.8 ± 10.7	<0.0001
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	26.2 ± 3.3	26.7 ± 3.8	27.9 ± 3.2	29.4 ± 4.4	0.001
<b>WHR</b>	0.92 ± 0.06	0.92 ± 0.08	0.95 ± 0.07	0.98 ± 0.08	0.009
<b>TAS (mm Hg)</b>	122.4 ± 14.7	124.9 ± 10.3	132 ± 16.6	135.5 ± 17	<0.001
<b>TAD (mm Hg)</b>	76.2 ± 9.8	76.4 ± 9	81.1 ± 8.9	81.8 ± 7.5	0.009
<b>Glucosa en dejú (mg/dl)</b>	92 ± 8	113 ± 2.2	100.2 ± 10.9	122 ± 28	<0.0001
<b>Insulina en dejú (mU/l)</b>	7.7 ± 4.5	8 ± 3.8	11.5 ± 5.8	13.5 ± 10.5	0.001
<b>HbA<sub>1c</sub> (%)</b>	4.7 ± 0.39	4.8 ± 0.45	4.9 ± 0.35	5.4 ± 1.1	<0.0001
<b>Colesterol HDL (mg/dl)</b>	55.4 ± 14	50.9 ± 11.4	51.2 ± 9.5	46.4 ± 9.4	0.014
<b>Log Triglicèrids en dejú (mg/dl)</b>	1.88 ± 0.21	1.95 ± 0.17	1.98 ± 0.24	2.12 ± 0.23	<0.0001
<b>Log Sensibilitat a la insulina<sup>†</sup> (10<sup>-4</sup> mU/l)</b>	0.58 ± 0.2	0.52 ± 0.06	0.40 ± 0.15	0.26 ± 0.21	<0.0001
<b>Log SP-A (ng/ml)</b>	1.46 ± 0.13	1.45 ± 0.13	1.53 ± 0.13*	1.54 ± 0.15*	0.008

\*p=0.04 després del test de Tukey quan es comparen amb subjectes amb tolerància normal a la glucosa.

†mesurat en 54 subjectes amb tolerància normal a la glucosa, en 7 individus amb intolerància a la glucosa en dejú, en 27 homes amb intolerància a la glucosa i en 9 individus amb diabetis tipus 2.

IMC: índex de massa corporal; WHR: índex cintura-maluc; TAS: tensió arterial sistòlica; TAD: tensió arterial diastòlica; HbA<sub>1c</sub>: hemoglobina glicada; SP-A : proteïna surfactant A.

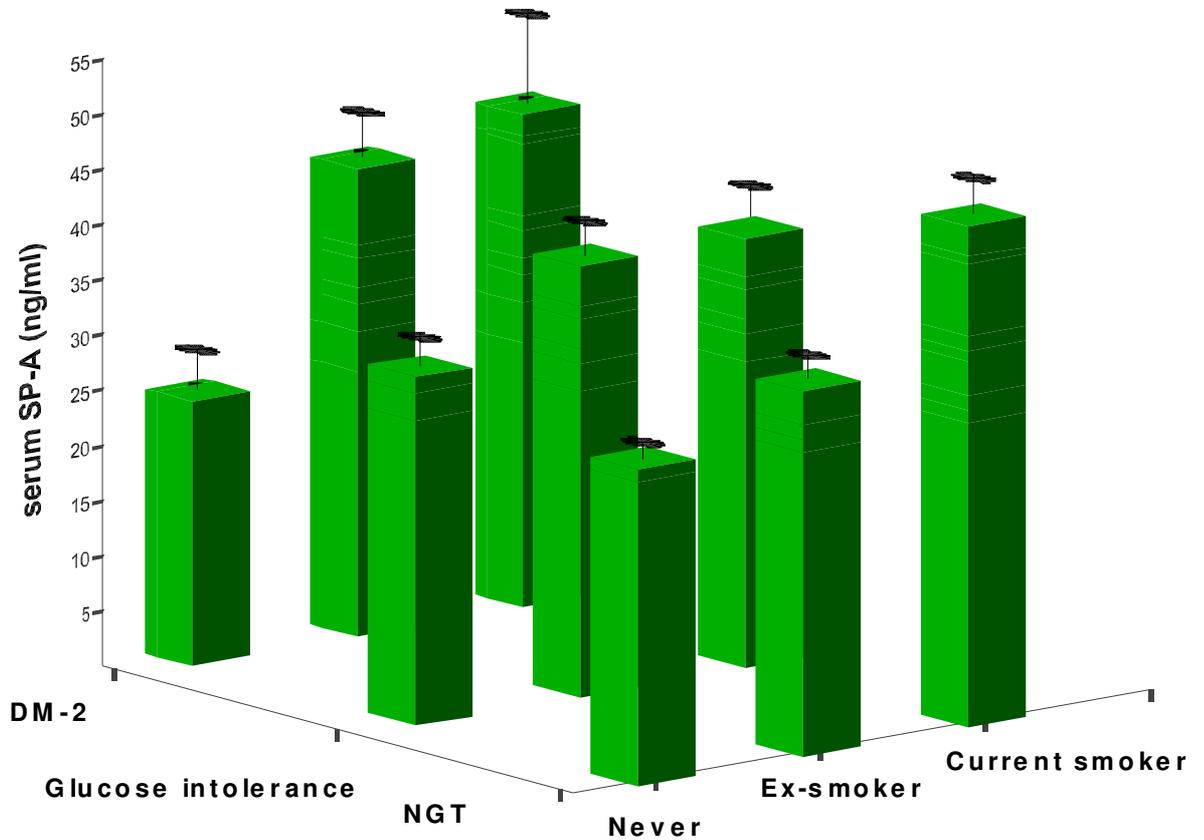
Els subjectes amb intolerància a la glucosa o diabètics tipus 2 tenen significativament més edat, més pes, i mostren menys sensibilitat a la insulina que els individus amb tolerància normal a la glucosa. La concentració de SP-A circulant és significativament més elevada en pacients amb intolerància a la glucosa i en pacients diabètics tipus 2 que en subjectes amb tolerància normal a la glucosa (Taula 4.2.1. i Figura 4.2.3.) fins i tot després d'ajustar els resultats per l'IMC, l'edat i l'estat del fumar (exfumadors/ que mai han fumat).



***Figura 4.2.3.***: Interval de confiança per la mitjana del log de l'SP-A sèrica d'acord amb l'estat de tolerància a la glucosa en tots els pacients (gràfica superior) i en els subjectes amb sobrepès i obesos (gràfica inferior).

---

L'estat de tolerància a la glucosa i l'estat del fumar tenen efectes additius en la concentració de l'SP-A circulant (Figura 4.2.4.).



**Figura 4.2.4.:** Els efectes de l'estat de tolerància a la glucosa sobre la concentració sèrica de SP-A són additius al fet de fumar.

En el total dels subjectes no fumadors, l'SP-A circulant està significativament i positivament correlacionada amb l'IMC, el WHR, la glucosa sèrica al minut 120 de l'OGTT (després d'una presa (dosi) de glucosa), amb l'hemoglobina glicada, amb la insulina sèrica en dejú i després d'una presa (dosi) de glucosa, i amb els triglicèrids en

dejú. I l'SP-A circulant està correlacionada negativament amb la sensibilitat a la insulina (Taula 4.2.2.).

**Taula 4.2.2.**

**CORRELACIÓ ENTRE L'SP-A CIRCULANT I VARIABLES BIOQUÍMIQUES EN SUBJECTES NO FUMADORS.**

	Tots els no fumadors (=164)	<i>P</i>	Subjectes Normotolerants (N=92)	<i>P</i>	Subjectes amb intolerància a la glucosa (N=72)	<i>P</i>
IMC	<b>0.19</b>	<b>0.01</b>	<b>0.22</b>	<b>0.03</b>	<b>0.25</b>	<b>0.03</b>
WHR	<b>0.35</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>0.29</b>	<b>0.005</b>	<b>0.48</b>	<b>&lt;0.0001</b>
Glucosa en dejú	0.11	0.2	0.17	0.1	-0.09	0.4
Glucosa 120' OGTT	<b>0.28</b>	<b>&lt;0.0001</b>	-0.01	0.9	<b>0.32</b>	<b>0.008</b>
HbA1c	<b>0.21</b>	<b>0.007</b>	<b>0.24</b>	<b>0.02</b>	0.08	0.5
Insulina en dejú	<b>0.23</b>	<b>0.006</b>	0.08	0.5	<b>0.26</b>	<b>0.03</b>
Insulina 120' OGTT	<b>0.22</b>	<b>0.01</b>	-0.07	0.5	<b>0.27</b>	<b>0.03</b>
Triglicèrids	<b>0.20</b>	<b>0.01</b>	-0.06	0.5	<b>0.35</b>	<b>0.003</b>
Colesterol HDL	-0.10	0.2	0.08	0.3	-0.22	0.06
<i>S<sub>I</sub></i>	<b>-0.44</b> (n=89)	<b>&lt;0.0001</b>	-0.26 (n=53)	0.09	<b>-0.59</b> (n=36)	<b>&lt;0.0001</b>

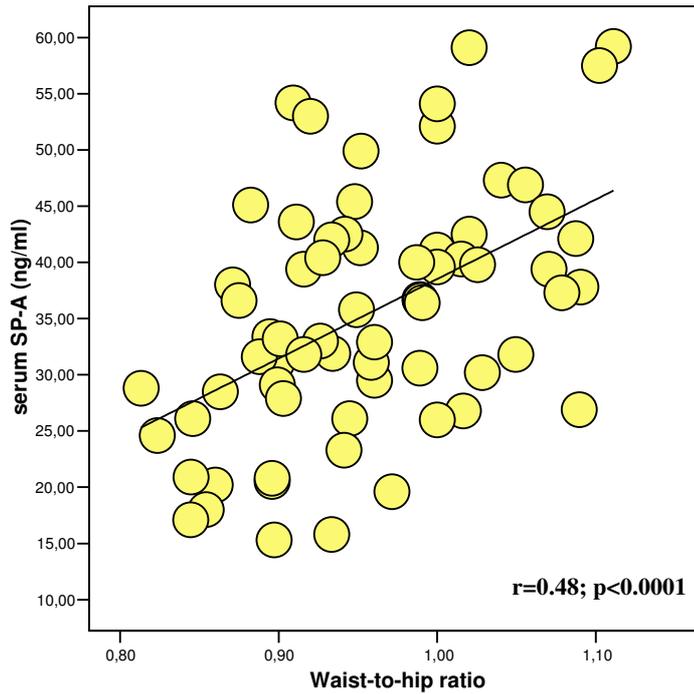
IMC: índex de massa corporal; WHR: índex cintura-maluc; HbA1c: hemoglobina glicada; OGTT: test oral de tolerància a la glucosa; 120': indica els minuts després de la presa (dosi) de glucosa; *S<sub>I</sub>*: sensibilitat a la insulina.

L'SP-A no s'associa amb l'edat. En subjectes amb intolerància a la glucosa aquestes associacions són més consolidades (com s'observa en la relació entre la concentració de l'SP-A i el WHR (Figura 4.2.5.A.) i entre la concentració de l'SP-A i la sensibilitat a la insulina (Figura 4.2.5.B.)).

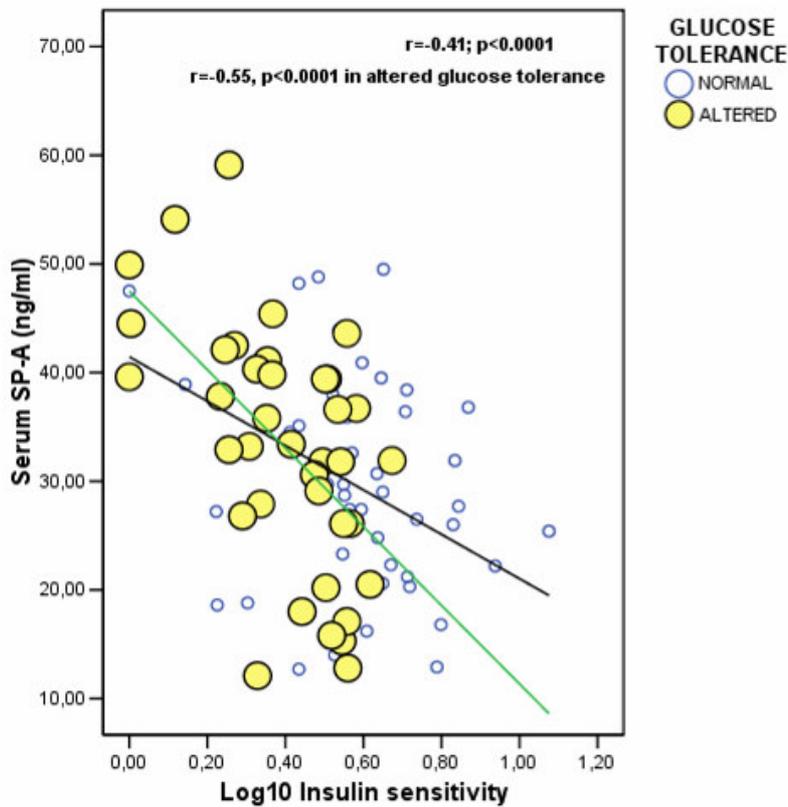
Les associacions entre l'SP-A i les variables metabòliques són similars entre els subjectes que mai han fumat i els exfumadors.

Les diferències més significatives s'han trobat en els subjectes amb sobrepès i obesos amb intolerància a la glucosa (intolerants a la glucosa o diabètics tipus 2) (n=59), els quals mostren unes concentracions de SP-A sèriques significativament més elevades (mitjana del 24%) que els individus obesos amb tolerància normal a la glucosa (n=58) (Log SP-A  $1.54 \pm 0.13$  vs.  $1.44 \pm 0.13$ ,  $P < 0.0001$ ) (figura 4.2.3. gràfica inferior).

**A**



**B**



**Figura 4.2.5.:** Associació lineal entre la concentració de l'SP-A sèrica i l'índex cintura-maluc (WHR)

(A); i entre la concentració de l'SP-A sèrica i la sensibilitat a la insulina (B).

Finalment s'efectua una anàlisi de regressió linial múltiple per predir l'SP-A circulant. Es consideren com a variables independents aquelles que tenen associacions més significatives en l'anàlisi univariant. La sensibilitat a la insulina ( $P=0.003$ ) contribueix independentment en el 22% de la variància de l'SP-A en el conjunt de tots els individus. En un altre model, la creatinina sèrica i la proteïna C-reactiva no canvien la influència independent de la sensibilitat a la insulina en la concentració de SP-A circulant (Taula 4.2.3.).

**Taula 4.2.3.**

**ANÀLISI DE REGRESSIÓ LINIAL MÚLTIPLE AMB L'SP-A SÈRICA COM A VARIABLE DEPENDENT.**

	Tots els subjectes				Subjectes amb intolerància a la glucosa			
	Beta	Sig.	Beta	Sig.	Beta	Sig.	Beta	Sig.
IMC	-0.102	0.462			0.066	0.709		
WHR	0.231	0.069	0.192	0.106	0.145	0.348	0.143	0.336
Log $S_I$	-0.453	<b>0.003</b>	-0.293	<b>0.016</b>	-0.459	<b>0.019</b>	-0.439	<b>0.007</b>
Log triglicèrids en dejú	0.205	0.085	0.074	0.506	0.348	0.027	0.246	0.112
120'OGTT Glucosa	-0.203	0.144			-0.147	0.371		
Creatinina			-0.15	0.147			-0.155	0.282
Log Proteïna C- reactiva			-0.161	0.133			-0.091	0.527
<b><math>R^2</math> Ajustat</b>	<b>0.22</b>		<b>0.17</b>		<b>0.37</b>		<b>0.38</b>	

IMC: índex de massa corporal; WHR: índex cintura-maluc;  $S_I$  : sensibilitat a la insulina; 120': indica els minuts després de la presa (dosi) de glucosa.

Quan l'anàlisi es porta a terme amb els subjectes amb intolerància a la glucosa, la sensibilitat a la insulina ( $P=0.01$ ) i els triglicèrids en dejú ( $P=0.02$ ) contribueixen independentment en el 37% de la variància de l'SP-A després d'ajustar els resultats per l'IMC, el WHR i la glucosa als 120' de l'OGTT (Taula 4.2.3.). Altra vegada, la creatinina i la proteïna C-reactiva sèriques no contribueixen en la variància de l'SP-A una vegada la sensibilitat a la insulina ha estat controlada.

Si, a més, es comparen aquestes últimes dades entre els subjectes exfumadors i els subjectes que mai han fumats no s'observen canvis significatius en els resultats.

### **4.3. RESULTATS DE LA 3<sup>a</sup> PART: LES DEFENSINES**

Les variables clíniques i bioquímiques dels subjectes (homes) de l'estudi es mostren a la taula 4.3.1. El subgrup de pacients als quals se'ls ha determinat la reactivitat vascular de l'artèria braquial (n=52) no presenta diferències significatives respecte al total de la població excepte que en aquest subgrup no s'observen diferències significatives en el fet de fumar.

**Taula 4.3.1.**

**VARIABLES ANTROPOMÈTRIQÜES I BIOQUÍMIQUES DELS SUBJECTES ESTUDIATS.**

	Tots els subjectes (homes)	Sub població amb la reactivitat vascular determinada
<b>VARIABLES</b>	<b>(n=113)</b>	<b>(n=52)</b>
<b>Edat (anys)</b>	52 [11]	53 [10]
<b>Fumadors (n,%)</b>	35 (31)	20 (39)
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	28 [4]	28 [3]
<b>WHR</b>	0.93 [0.07]	0.93 [0.07]
<b>TAS (mm Hg)</b>	126 [14]	126 [13]
<b>TAD (mm Hg)</b>	80 [9]	81 [9]
<b>Colesterol Total (mmol/l)</b>	5.3 [0.8]	5.4 [0.9]
<b>Colesterol LDL (mmol/l)</b>	3.4 [0.8]	3.4 [0.8]
<b>Colesterol HDL (mmol/l)</b>	1.4 [0.3]	1.4 [0.3]
<b>Triglicèrids (mmol/l)</b>	1.0 (0.7-1.4)	1.1 (0.7-1.5)
<b>Glucosa en dejú (mmol/l)</b>	5.3 [0.6]	5.3 [0.6]
<b>Glucosa als 120' OGTT (mmol/l)</b>	6.9 [1.7]	7.1 [1.8]
<b>Insulina en dejú (pmol/l)</b>	62 (42-78)	62 (44-84)
<b>S<sub>I</sub> (min<sup>-1</sup>·mIU/L·10<sup>-4</sup>)</b>	2.4 (1.5-3.5)	2.4 (1.6-3.7)
<b>S<sub>G</sub> (min<sup>-1</sup>)</b>	19 [6]	19 [6]
<b>AIRg (min·mIU/l)</b>	359 (191-539)	340 (190-544)
<b>PCR (mg/l)</b>	2.0 (1.0-4.0)	2.0 (1.0-5.0)
<b>sTNFR1 (µg/l)</b>	1.7 (1.3-2.1)	1.7 (1.4-2.1)
<b>sTNFR2 (µg/l)</b>	5.1 (3.7-8.4)	4.5 (3.2-6.1)
<b>DEFA1-3 (pg/ml)</b>	291 (222-429)	283 (225-490)

IMC: índex de massa corporal; WHR: índex cintura-maluc; TAS i TAD: tensió arterial sistòlica i diastòlica; OGTT: test oral de tolerància a la glucosa; 120': indica els minuts després de la presa (dosi) de glucosa; S<sub>I</sub>, S<sub>G</sub> i AIRg: sensibilitat a la insulina, efectivitat de la glucosa i resposta aguda de la insulina a la glucosa, respectivament; PCR: proteïna C-reactiva; sTNFR1 i sTNFR2: receptor 1 i 2 solubles del factor de necrosi tumoral; DEFA1-3: α-defensines 1-3. Les dades estan expressades com a mitjana de la desviació estàndard per variables Gaussians i la mediana i rang interquartil per variables no Gaussians.

### **4.3.1. RELACIÓ DE LES DEFA 1-3 CIRCULANTS AMB ELS PARÀMETRES METABÒLICS D'HOMES APARENTMENT SANS**

Per estudiar si les DEFA 1-3 ( $\alpha$ -defensines 1, 2 i 3 o HNP 1-3) estan associades a paràmetres metabòlics en humans, s'ha estratificat els subjectes a estudiar d'acord amb els quartils o rangs de concentració de les DEFA 1-3. S'han observat evidents associacions significatives entre les DEFA 1-3 i l'IMC, el WHR, els lípids en sèrum i la  $S_I$  ( $P < 0.02$  a  $P = 0.001$  per una ANOVA amb tendència lineal en comparacions entre els quartils de DEFA 1-3; Taula 4.3.2.).

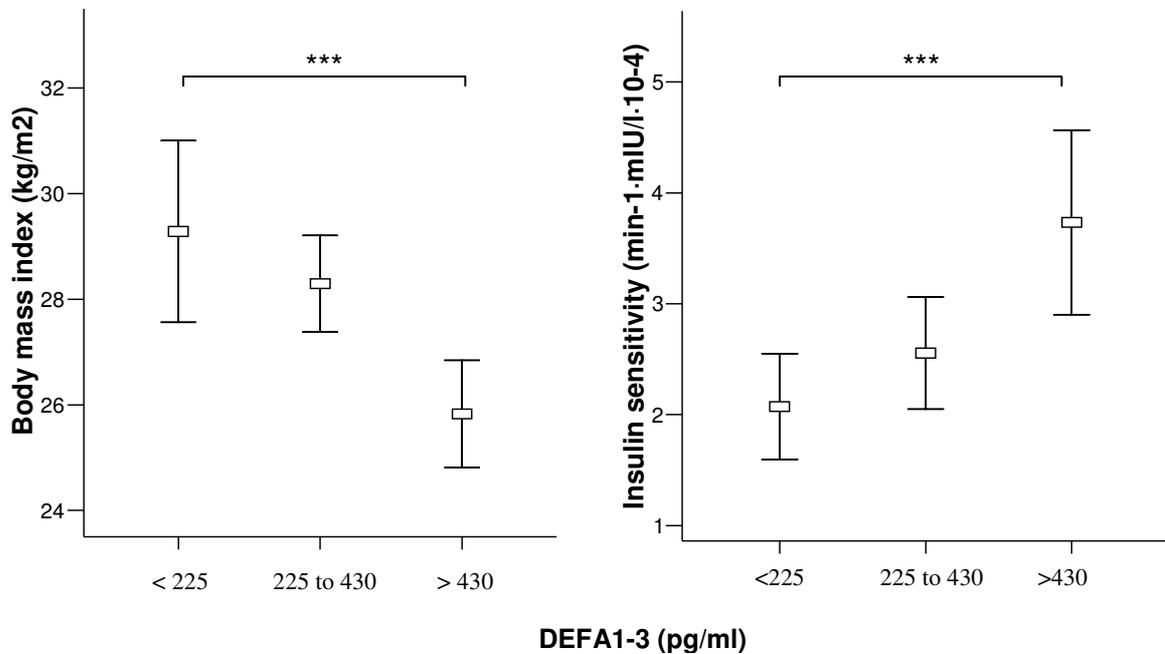
**Taula 4.3.2.**

**VARIABLES ANTROPOMÈTRIQÜES I BIOQUÍMIQUES SEGONS ELS QUARTILS (RANGS DE CONCENTRACIÓ) DE LES DEFA 1-3 DELS SUBJECTES A ESTUDIAR.**

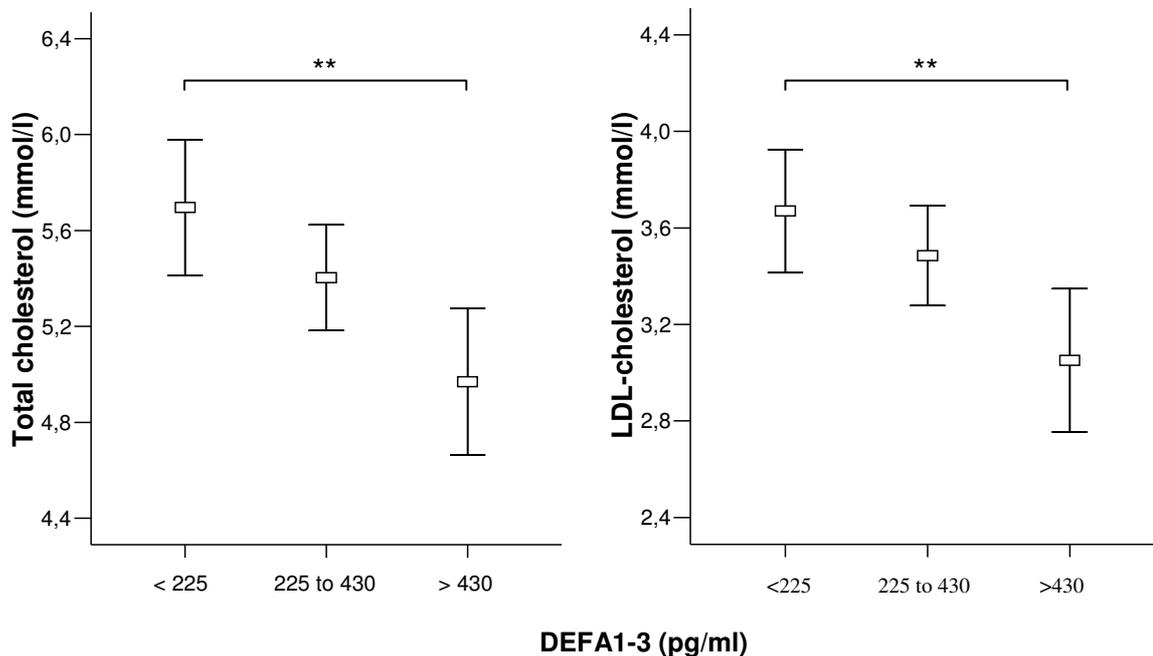
VARIABLES	DEFA1-3 (pg/ml)				P
	<225	225 a 290	291 a 430	>430	
N	29	28	28	28	
Edat (anys)	50 [9]	55 [13]	54 [10]	50.6 [12]	ns
Fumadors (n,%)	12 (41)	10 (36)	7 (25)	6 (21)	0.07
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	29 [4]	28 [3]	28 [3]	26 [3] <sup>†§</sup>	0.004
WHR	0.95 [0.08]	0.95 [0.05]	0.94 [0.08]	0.91 [0.07]	0.019
TAS (mm Hg)	127 [12]	129 [15]	130 [13]	122 [15]	ns
TAD (mm Hg)	81 [9]	81 [9]	82 [11]	80 [9]	ns
Colesterol Total (mmol/l)	5.7 [0.7]	5.4 [0.8]	5.4 [0.9]	5.0 [0.8] <sup>†‡</sup>	0.001
Colesterol LDL (mmol/l)	3.7 [0.7]	3.5 [0.7]	3.5 [0.8]	3.1 [0.8] <sup>*‡</sup>	0.003
Colesterol HDL (mmol/l)	1.3 [0.4]	1.3 [0.3]	1.4 [0.3]	1.5 [0.4]	0.008
Triglicèrids (mmol/l)	1.1 (0.8-2.0)	1.0 (0.8-1.3)	0.9 (0.6-1.5)	0.9 (0.6-1.2)	ns
Glucosa en dejú (mmol/l)	5.4 [0.5]	5.3 [0.5]	5.3 [0.7]	5.3 [0.6]	ns
Glucosa als 120' OGTT (mmol/l)	7.3 [2.0]	7.1 [1.4]	6.9 [1.8]	6.4 [1.7]	0.07
Insulina en dejú (pmol/l)	64 (46-100)	66 (43-84)	64 (42-105)	55 (37-72)	ns
S <sub>I</sub> (min <sup>-1</sup> ·mIU/L·10 <sup>-4</sup> )	2.0 (1.0-2.8)	2.3 (1.8-2.6)	2.2 (1.0-4.1)	3.2 (2.3-4.8) <sup>†</sup>	0.002
S <sub>G</sub> (min <sup>-1</sup> )	19 [4]	19 [6]	20 [4]	20 [9]	ns
AIRg (min·mIU/l)	326 (167-448)	443 (199-538)	359 (214-578)	290 (106-438)	ns
PCR (mg/l)	1.0 (1.0-4.3)	3.0 (1.0-6.0)	2.0 (1.0-4.0)	1.0 (1.0-4.0)	ns
sTNFR1 (µg/l)	1.7 (1.4-2.2)	1.7 (1.2-2.1)	1.5 (1.2-1.7)	1.8 (1.4-2.1)	ns
sTNFR2 (µg/l)	4.3 (3.1-5.7)	5.2 (3.6-8.9)	6.9 (4.6-11.6)	5.3 (3.7-8.5)	ns

DEFA1-3: α-defensines 1-3; IMC: índex de massa corporal; WHR: índex cintura-maluc; TAS i TAD: tensió arterial sistòlica i pressió arterial diastòlica; OGTT: test oral de tolerància a la glucosa; 120': indica els minuts després de la presa (dosi) de glucosa; S<sub>I</sub>, S<sub>G</sub> i AIRg: sensibilitat a la insulina, efectivitat de la glucosa i resposta aguda de la insulina a la glucosa, respectivament; PCR: proteïna C-reactiva; sTNFR1 i sTNFR2: receptor 1 i 2 solubles del factor de necrosi tumoral. Les dades estan expressades com a mitjana [SD] per les variables Gaussians variables i com a mediana i rang interquartil per les variables no Gaussians. Els valors de P estan calculats per una ANOVA amb tendència lineal, excepte per les comparacions segons el fet de fumar (associació *linear-by-linear*). Comparacions *Post-hoc* (Bonferroni): \*P<0.05 and †P<0.01, comparat amb el primer quartil. Models lineals generals: ‡P<0.05 and §P<0.01, comparat amb el primer quartil, després d'ajustar per l'edat (IMC), i edat, el fet de fumar, l'IMC i S<sub>I</sub> (colesterol total i colesterol LDL).

Les figures 4.3.1. i 4.3.2. mostren les associacions entre les DEFA 1-3 circulants i l'IMC, la  $S_I$  i el colesterol total i el colesterol LDL (els individus del segon i el tercer quartil (rang de concentració) de les DEFA 1-3 circulants tenen variables antropomètriques i bioquímiques similars i, per aquesta raó, es mostren juntes).



**Figura 4.3.1.:** Gràfic de barres d'error de l'IMC i la  $S_I$  d'acord amb les DEFA 1-3 circulants en homes aparentment sans. El primer i l'últim grup representen el primer i el quart quartil, respectivament, de DEFA 1-3 circulants. Els plots són representats per la mitjana i per un CI del 95%. \*\*\* $P<0.0001$  per una ANOVA amb tendència lineal. DEFA 1-3: alfadefensines 1, 2 i 3.



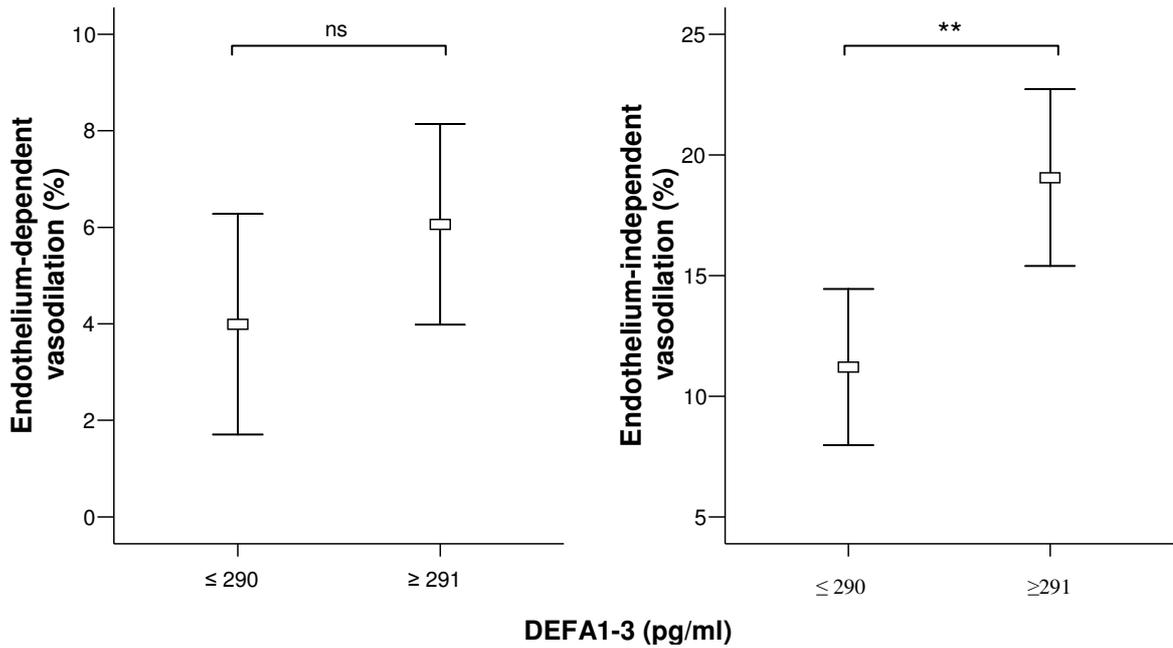
**Figura 4.3.2.:** Gràfica de barres d'error del colesterol total i el colesterol LDL d'acord amb les DEFA 1-3 circulants en homes aparentment sans. El primer i l'últim grup representen el primer i el quart quartil de les DEFA 1-3 circulants, respectivament. Els plots són representats per la mitjana i per un CI del 95%. \*\* $P < 0.005$  per una ANOVA amb tendència lineal. DEFA 1-3: alfadefensines 1, 2 i 3.

Es va testar si les associacions entre les DEFA 1-3 circulants i els paràmetres metabòlics eren independents dels efectes modificadors coneguts. Després d'ajustar per l'edat (en el cas de l'IMC), i per l'edat, el fet de fumar, l'IMC i la  $S_I$  (en el cas dels lípids en sèrum), s'observa que els subjectes amb el quartil més elevat de DEFA 1-3 en plasma són significativament més prims ( $P < 0.01$ ) i presenten menys colesterol total i menys colesterol LDL ( $P < 0.05$ ) que els subjectes de quartils inferiors (Taula 4.3.2.).

Malgrat aquests resultats, no s'observa cap relació entre les DEFA 1-3 circulants i alguns marcadors d'inflamació (proteïna C-reactiva, sTNFR1 i sTNFR2) (Taula 4.3.2.).

#### **4.3.2. RELACIÓ DE LES DEFA 1-3 CIRCULANTS AMB LA FUNCIO VASCULAR EN HOMES APARENTMENT SANS**

En una subpoblació dels individus estudiats de 52 homes aparentment sans (Taula 4.3.1.) s'ha determinat la reactivitat vascular de l'artèria braquial. S'enregistra un increment de la vasodilatació endoteliindependent (EIV) en els pacients amb valors de DEFA 1-3 circulants superiors a la mitjana de la població estudiada *vs.* els pacients amb valors de DEFA 1-3 circulants inferiors a la mitjana [mitjana (95% CI): 18% (15-22%) *vs.* 12% (9-15%), respectivament;  $P < 0.005$  (no ajustat) i  $P = 0.017$  (ajustat per l'edat, el fet de fumar, l'IMC, el colesterol total, el colesterol LDL, la  $S_f$  i el diàmetre basal de l'artèria)]. Aquestes diferències són més marcades en subjectes amb sobrepès (IMC  $\geq 25 \text{ kg/m}^2$ ) ( $n=40$ ; ajustat  $P < 0.005$ ; Figura 4.3.3.). No hi ha diferències significatives en la vasodilatació endotelidependent en cap dels grups ni en els subjectes amb sobrepès (ajustat  $P = 0.39$ ; Figura 4.3.3.).



**Figura 4.3.3.:** Gràfica amb barres d'error de la vasodilatació endoteliddependent i endoteliindependent (reactivitat de l'artèria braquial) d'acord amb les DEFA 1-3 circulants en homes aparentment sans amb sobrepès (IMC  $\geq 25$  kg/m<sup>2</sup>; n=40). El punt de tall de les DEFA 1-3 és la mitjana dels subjectes estudiats. Els plots representen la mitjana i una CI del 95%. \*\* $P < 0.005$  procedent d'un test de *Student*. DEFA 1-3: alfa defensines 1, 2 i 3.

### **4.3.3. RELACIÓ DE LES DEFA 1-3 CIRCULANTS I ELS PARÀMETRES METABÒLICS EN HOMES APARENTMENT SANS PER ANÀLISI BIVARIANT I ANÀLISI DE REGRESSIÓ MÚLTIPLE**

En correlacions bivariants, les DEFA 1-3 estan significativament associades amb l'IMC ( $r = -0.29$ ,  $P = 0.002$ ), amb el WHR ( $r = -0.23$ ,  $P = 0.014$ ), el colesterol total i el colesterol LDL ( $r = -0.29$ ,  $P = 0.002$  i  $r = -0.27$ ,  $P = 0.003$ , respectivament), i els triglicèrids en sèrum

( $r=-0.26$ ,  $P=0.006$ ) i la  $S_I$  ( $r=0.27$ ,  $P=0.005$ ). També s'observen evidents associacions significatives entre les DEFA 1-3 i l'EIV ( $r=0.29$ ,  $P=0.040$  i  $r=0.40$ ,  $P=0.011$ , per tots els subjectes i pels subjectes amb sobrepès, respectivament).

També hi ha un efecte significatiu del fet de fumar sobre les DEFA 1-3: els fumadors presenten una reducció de la concentració de DEFA 1-3 circulants respecte els no fumadors [mitjana (95% CI): 324 pg/ml (206-441 pg/ml) vs. 432 pg/ml /362-502 pg/ml), respectivament;  $P<0.05$ ]. Aquest efecte és independent de l'edat, l'IMC, el colesterol total i el colesterol LDL, i la  $S_I$  ( $P<0.05$ , ajustat per aquestes covariants).

En l'anàlisi de regressió múltiple (Taula 4.3.3.), l'IMC, el colesterol total i el colesterol LDL, i el fet de fumar, però no l'edat i la  $S_I$ , són predictors independents de les DEFA 1-3 circulants, explicant-se el 8%, 4% i 3% d'aquestes variacions (percentatge en què disminueixen les DEFA 1-3 circulants), respectivament (la proporció de variació de les DEFA 1-3 causada pel colesterol total i el colesterol LDL augmenta un 11% en els individus amb sobrepès;  $n=89$ ).

**Taula 4.3.3.**

**ANÀLISI DE REGRESSIÓ MÚLTIPLE DE LES DEFA 1-3 PLASMÀTIQUES COM A VARIABLE DEPENDENT EN SUBJECTES APARENTMENT SANS.**

<i>Variables Independents</i>	DEFA1-3		
	Beta	Sig.	R quadrat
<b>Edat (anys)</b>	-0.01	0.89	-
<b>Fumar*</b>	-0.18	0.044	0.03
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)*</b>	-0.26	0.005	0.08
<b>Colesterol Total o Colesterol LDL (mmol/l)*</b>	-0.22	0.015	0.04
<b>S<sub>1</sub> (min<sup>-1</sup>·mIU/L·10<sup>-4</sup>)</b>	0.08	0.49	-

DEFA1-3: α-defensines 1-3; IMC: Índex de massa corporal; S<sub>1</sub>: sensibilitat a la insulina (procedent del test de tolerància a la glucosa amb mostreig freqüent: FSIGT). \* Variables Predictives.

S'han realitzat anàlisis similars amb el colesterol LDL i l'EIV com a variables dependents (Taula 4.3.4.). En aquests models, les DEFA 1-3 circulants determinen el 8% i el 9% de variació de colesterol LDL i EIV, respectivament.

**Taula 4.3.4.**

**ANÀLISI DE REGRESSIÓ MÚLTIPLE DEL COLESTEROL LDL I LA VASODILATACIÓ ENDOTELIINDEPENDENT COM A VARIABLES DEPENDENTS EN SUBJECTES APARENTMENT SANS.**

<i>Variables Independents</i>	Variables Dependents			
	Colesterol LDL		EIV	
	Beta	Sig.	Beta	Sig.
<b>Edat (anys)</b>	0.05	0.62	-0.16	0.22
<b>Fumar</b>	-0.06	0.51	0.04	0.75
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	0.03	0.82	-0.46	0.002*
<b>Colesterol Total (mmol/l)</b>	-	-	-0.03	0.84
<b>DEFA1-3 (pg/ml)</b>	-0.23	0.018*	0.32	0.022*
<b>S<sub>I</sub> (min<sup>-1</sup>·mIU/L·10<sup>-4</sup>)</b>	-0.20	0.036*	-0.01	0.94
<b>Diàmetre basal de l'artèria</b>	-	-	-0.04	0.76

IMC: índex de massa corporal; S<sub>I</sub>: sensibilitat a la insulina (procedent del test de tolerància a la glucosa amb mostreig freqüent: FSIGT); DEFA1-3: α-defensines 1-3. \* Variables Predictives.

R<sup>2</sup> ajustada pel colesterol LDL: DEFA1-3: 0.08; S<sub>I</sub>: 0.03.

R<sup>2</sup> ajustada per l'EIV: IMC 0.22; DEFA1-3: 0.09.



#### **4.4. RESULTATS DE LA 4<sup>a</sup> PART: LA VISFATINA**

Les variables clíniques i bioquímiques dels individus estudiats es resumeixen a les taules 4.4.1. i 4.4.2.

##### **Taula 4.4.1.**

##### **VARIABLES CLÍNiques I DE LABORATORI DELS INDIVIDUS NO DIABÈTICS.**

	<b>Homes NO DIABÈTICS</b>
<b>VARIABLES</b>	<b>(n=103)</b>
<b>Edat (anys)</b>	51.7 (11.7)
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	27.5 (4.0)
<b>WHR (índex cintura/maluc)</b>	0.92 (0.07)
<b>TAS (mm Hg)</b>	126 (15)
<b>TAD (mm Hg)</b>	80 (10)
<b>Colesterol HDL (mg/dl)</b>	54 (12)
<b>Triglicèrids (mg/dl)</b>	88 (67-126)
<b>Glucosa en dejú (mg/dl)</b>	96 (13)
<b>Insulina en dejú (mIU/L)</b>	8.2 (5.9-13.0)
<b>S<sub>I</sub> (min<sup>-1</sup>·mIU/L·10<sup>-4</sup>)</b>	2.4 (1.6-3.6)
<b>S<sub>G</sub> (min<sup>-1</sup>)</b>	0.020 (0.006)
<b>AIRg (min·mIU/L)</b>	367 (207-519)
<b>Visfatina (ng/mL)</b>	14 (13-17)

IMC: índex de massa corporal; WHR: índex cintura-maluc; TAS i TAD: tensió arterial sistòlica i diastòlica; S<sub>I</sub>, S<sub>G</sub> i AIRg: sensibilitat a la insulina, efectivitat de la glucosa i resposta aguda de la insulina a la glucosa, respectivament (procedent del test de tolerància a la glucosa amb mostreig freqüent: FSIGT). Les dades són la mitjana (SD) per les variables Gaussianes i la mediana i el rang interquartil per les variables no Gaussianes.

**Taula 4.4.2.**

**VARIABLES CLÍNiques I DE LABORATORI DE PACIENTS DIABÈTICS.**

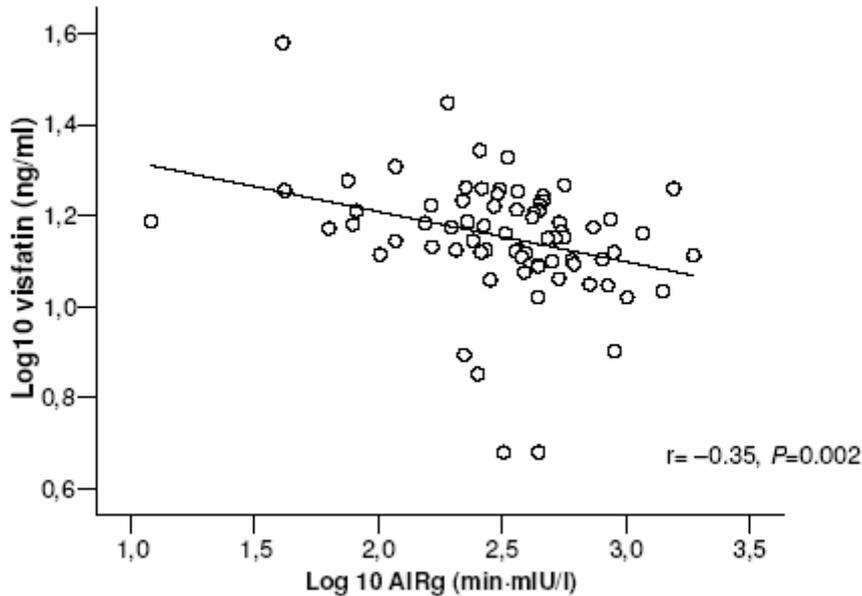
	Homes DM 2	Dones DM 2		Homes DM 1	Dones DM 1	
<b>Variables</b>	<b>(n=31)</b>	<b>(n=26)</b>	<b>P</b>	<b>(n=11)</b>	<b>(n=13)</b>	<b>P</b>
Edat (anys)	54.9 (10.0)	59.2 (9.8)	Ns	39.1 (12.1)	42.0 (17.4)	Ns
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	30.0 (4.3)	34.1 (5.7)	0.003	24.6 (2.0)	23.9 (3.2)	Ns
TAS (mm Hg)	134 (18)	138 (20)	Ns	124 (10)	118 (23)	Ns
TAD (mm Hg)	81 (9)	80 (8)	Ns	76 (8)	69 (15)	Ns
Colesterol HDL (mg/dl)	49 (13)	55 (16)	Ns	55 (12)	71 (11)	0.051
Triglicèrids (mg/dl)	156 (108-246)	160 (101-213)	Ns	108 (60-183)	69 (52-121)	Ns
Glucosa en dejú (mg/dl)	133 (39)	163 (42)	Ns	152 (86)	209 (57)	Ns
HbA <sub>1c</sub> (%)	6.0 (1.5)	7.1 (1.4)	0.008	6.7 (1.4)	7.4 (0.9)	Ns
Visfatina (ng/mL)	17 (13-21)	22 (18-25)	0.001	31 (27-34)	28 (20-33)	Ns

DM 2 i DM 1: diabetis mellitus tipus 2 i tipus 1; IMC: índex de massa corporal; TAS i TAD: tensió arterial sistòlica i diastòlica; HbA<sub>1c</sub>: hemoglobina glicada. Les dades són la mitjana (SD) per les variables Gaussians i la mediana i el rang interquartil per les variables no Gaussians. Els valors de *P* que es mostren a la dreta de cada categoria provenen del test de *Student* per a mostres no aparellades on es comparen homes i dones.

**4.4.1. RELACIÓ DE LA VISFATINA CIRCULANT EN HOMES NO DIABÈTICS AMB LA SECRECIÓ D'INSULINA I AMB LA SENSIBILITAT A LA INSULINA**

La visfatina circulant està significativament associada a l'AIRg (resposta aguda de la insulina a la glucosa) ( $r = -0.24$ ,  $P=0.014$ ) en homes no-DM i aquesta associació és major en homes tolerants a la glucosa ( $n=74$ ;  $r = -0.35$ ,  $P=0.002$ ; Figura 4.4.1.). De forma semblant la visfatina circulant es correlaciona negativament amb la insulina als

30-min de l'OGTT en homes no DM ( $r = -0.18$ ,  $P=0.048$ ) i en homes tolerants a la glucosa ( $r = -0.28$ ,  $P=0.009$ ).



**Figura 4.4.1.:** Gràfica amb la correlació del  $\log_{10}$  d'AIRg (procedent d'estudis FSIGT) amb el  $\log_{10}$  de la concentració de visfatina en sèrum en homes tolerants a la glucosa. Els valors de  $r$  i  $P$  es mostren a partir de l'anàlisi de *Pearson* (dades no ajustades). AIRg: resposta aguda de la insulina a la glucosa.

No s'han trobat correlacions significatives entre la visfatina i l'IMC, el perímetre de la cintura, l'Sg, l'HbA1c i la glucosa plasmàtica a les 2 hores de l'OGTT en individus no DM o en subjectes tolerants a la glucosa.

La visfatina en sèrum també està significativament correlacionada amb la  $S_I$  en homes no DM ( $r = 0.21$ ,  $P=0.032$ ). No obstant, en l'anàlisi de regressió múltiple, l'AIRg és l'únic predictor de visfatina circulant, explicant entre el 4% i el 8% de la seva variància

en homes no DM (dades no mostrades) i en homes tolerants a la glucosa (taula 4.4.3), respectivament.

**Taula 4.4.3.**

**ANÀLISI DE REGRESSIÓ MÚLTIPLE DE VISFATINA EN SÈRUM COM A VARIABLE DEPENDENT EN HOMES TOLERANTS A LA GLUCOSA.**

<i>Variables Independents</i>	<b>Variable dependent Log<sub>10</sub> Visfatina</b>	
	<b>Beta</b>	<b>P</b>
<b>Edat</b>	-0.068	0.555
<b>IMC</b>	0.018	0.878
<b>Log<sub>10</sub> S<sub>I</sub></b>	-0.051	0.660
<b>Log<sub>10</sub> AIRg</b>	-0.310	0.007*

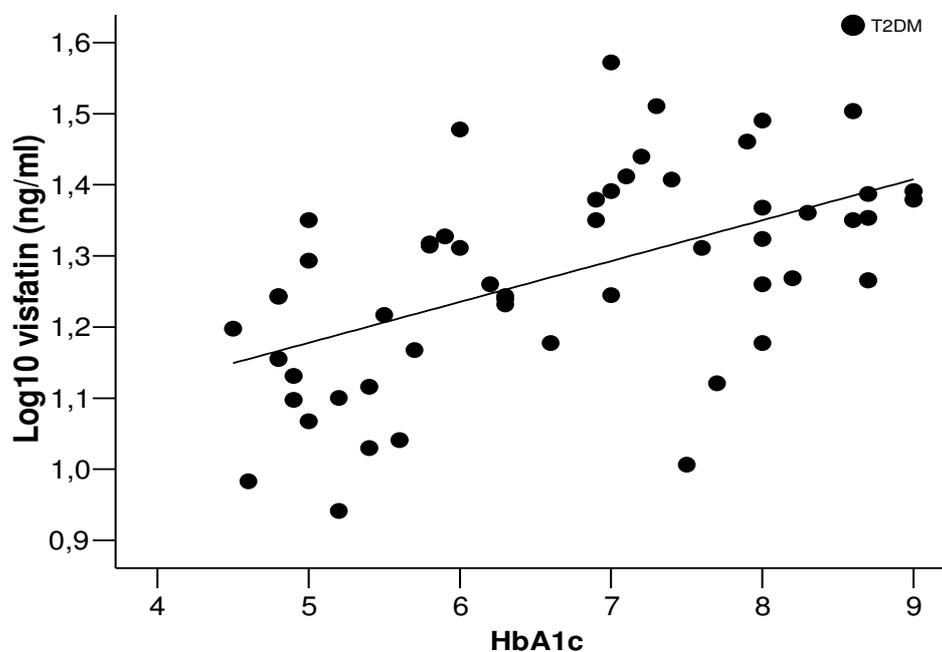
IMC: índex de massa corporal; S<sub>I</sub> i AIRg sensibilitat a la insulina i resposta aguda de la insulina a la glucosa, respectivament (procedent dels tests de tolerància a la glucosa amb mostreig freqüent). \* R<sup>2</sup>= 0.083

**4.4.2. RELACIÓ DE LA VISFATINA CIRCULANT AMB LA DM 2**

La visfatina en sèrum es troba elevada en individus amb diabetis tipus 2 [mitjana (95% CI): 19 (18-21) vs. 16 (15-17), per a DM 2 i no DM, respectivament;  $P < 0.0001$  (no ajustada),  $P = 0.005$  (ajustada per sexe, edat i IMC)].

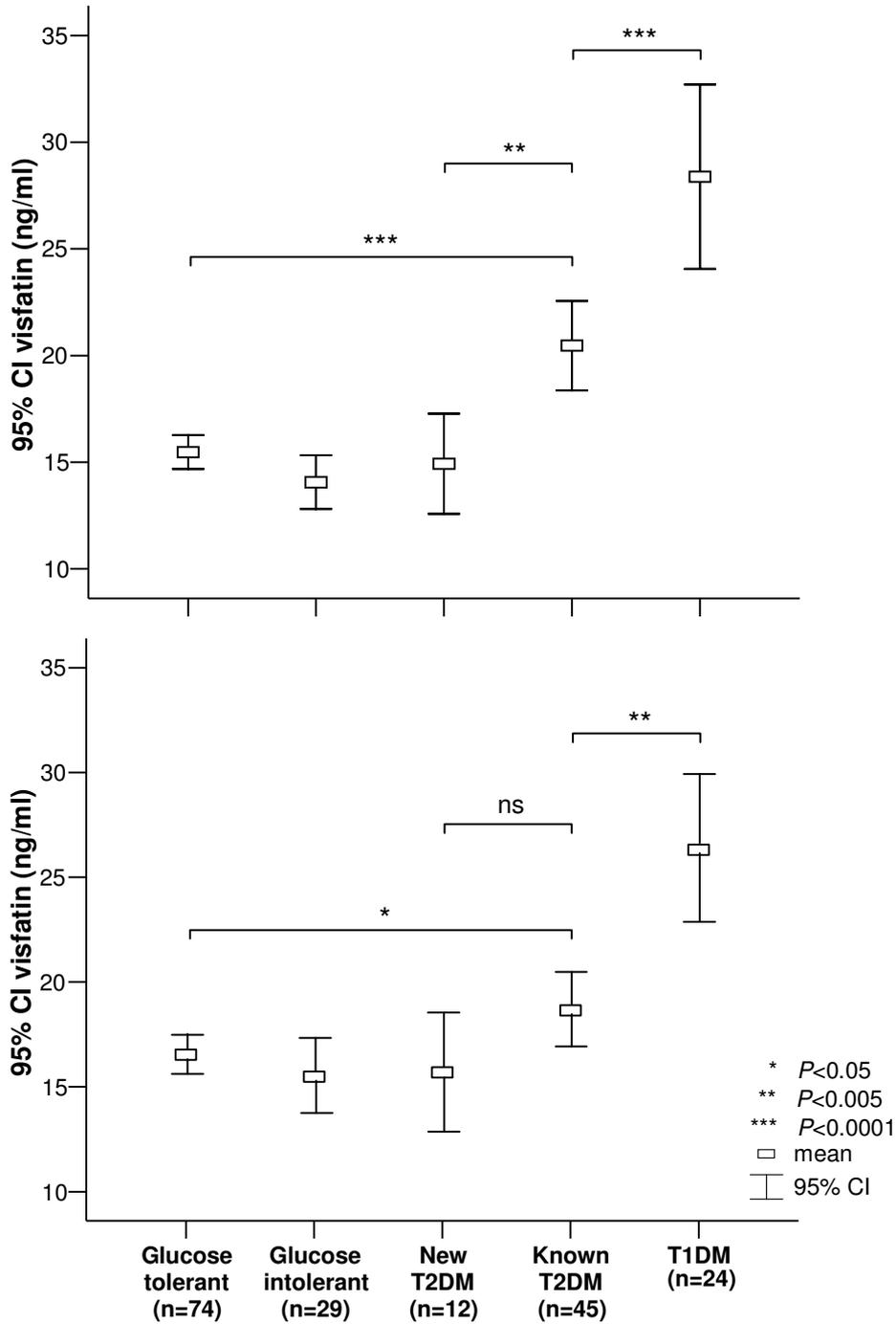
En aquests individus, l'HbA1c està altament correlacionada amb la visfatina circulant ( $r = 0.59$ ,  $P < 0.0001$ ; Figura 4.4.2.), i ajustant els resultats per l'HbA1c s'atenuen les

diferències significatives en les concentracions sèriques de visfatina entre DM 2 i individus no DM. [mitjana (95% CI): 17 (16-19) vs. 17 (16-18), respectivament;  $P=0.51$  (ajustat per sexe, edat, IMC i HbA1c)].



**Figura 4.4.2.:** Correlació de l'HbA1c amb  $\log_{10}$  de la concentració de visfatina en sèrum en pacients DM 2 (les correlacions són similars per homes i dones).  $r$  i  $P$  s'obtenen mitjançant l'anàlisi de Pearson (dades no ajustades). HbA1c: hemoglobina glicada.

Per aprofundir en l'associació de la concentració de visfatina en plasma amb la DM 2, es divideixen els subjectes en pacients amb DM 2 coneguts (amb llarga evolució de la malaltia) (n=45) i pacients de diagnòstic recent (mitjançant OGTT; n=12) (Figura 4.4.3.). Els DM 2 coneguts, en contrast als subjectes DM 2 de diagnòstic recent, tenen valors augmentats de HbA1c [mitjana, SD: 6.9 (1.4) vs. 5.0 (0.9) vs. 4.9 (0.4), pels DM 2 coneguts, DM 2 de diagnòstic recent i no DM, respectivament;  $P < 0.0001$ ].



**Figura 4.4.3.:** Barres d'error (mitjana i CI 95%) de la concentració de visfatina en sèrum en els diferents grups d'individus estudiats (les dades venen representades per un conjunt d'homes i dones amb DM 1 i DM 2). El gràfic superior mostra les dades no ajustades. El gràfic inferior mostra les dades ajustades per sexe, edat, IMC i HbA1c. T2DM: diabètics tipus 2.

L'estudi dels individus amb DM 2 de llarga evolució (coneguts), indica un augment de la visfatina circulant, en aquesta malaltia [mitjana, (95% CI): 19 (17-21) vs. 17 (16-18), per els subjectes DM 2 de llarga evolució (coneguts) i els no DM, respectivament;  $P < 0.05$ ; Figura 4.4.3.]. Cal destacar que els subjectes DM 2 de diagnòstic recent presenten uns valors de visfatina circulant que són similars als dels individus no DM [mitjana (95% CI): 15 (14-17) vs. 15 (13-18), respectivament; NS (no significatiu) (ajustada per sexe, edat IMC i HbA1c); Figura 4.4.3.] i mostren només un defecte parcial en la funció de les cèl·lules  $\beta$ , amb valors detectables d'AIRg en molts d'aquest individus [mitjana (95% CI): 118 (0-341) vs. 483 (360-607), per els DM 2 de diagnòstic recent i no DM, respectivament;  $P = 0.004$  (ajustada per sexe, edat, IMC i HbA1c)].

En l'anàlisi de regressió múltiple, l'HbA1c, però no el sexe, l'edat ni l'IMC, és un predictor de la visfatina circulant en pacients DM 2, explicant el 23% de la seva variància ( $\beta = 0.494$ ,  $P < 0.0001$ ).

#### **4.4.3. RELACIÓ DE LA CONCENTRACIÓ DE VISFATINA CIRCULANT I LA DM 1**

Per tal de determinar si la concentració de visfatina en sèrum és dependent de la preservació de la funció de les cèl·lules  $\beta$  s'ha estudiat també un grup de pacients DM 1 [n=24; duració mitja de la diabetis, interval: 16 (6-27) anys] (Taula 4.4.2). S'observa que la visfatina circulant és més elevada en individus amb DM 1 vs. subjectes amb DM 2 i no DM. [mitjana (95% CI): 26 (22-29) vs. 17 (16-19) i 17 (16-18), respectivament;  $P < 0.005$  i  $P < 0.0001$  (ajustada per sexe, edat, IMC i HbA1c), per comparacions amb subjectes amb DM 2 i no DM, respectivament); Figura 4.4.3.].

## **5. DISCUSSIÓ**



La DM 2 és una malaltia multifactorial i multigènica. Aquest fet condueix a l'estudi d'un ampli ventall de gens i proteïnes susceptibles d'estar implicades amb la DM 2. Algunes d'aquestes proteïnes (citoquines, adipoquines, etc.) i gens estan associats a un estat lleu d'inflamació crònica, la qual pot desencadenar la síndrome metabòlica (SRI) i DM 2. S'ha observat que moltes d'aquestes proteïnes poden usar-se com a possibles marcadors de malaltia cardiovascular (la IL-18...), resistència a la insulina (el TNF- $\alpha$ , la IL-6, la ferritina, l'adiponectina, la BPI, l'LBP...) i futura DM 2 (el fibrinogen, la PCR, l'inhibidor 1 de l'activador del plasminogen...).

Aquest treball descriu la relació de quatre proteïnes amb la SRI i la DM 2. L'SP-D i l'SP-A, com a proteïnes del surfactant pulmonar, s'han estudiat per la relació que hi ha entre la disminució de la funció pulmonar i la resistència a la insulina (Lazarus R. i col., 1998) i pel fet de ser unes proteïnes amb funcions immunitàries (Kishore U. i col., 2005). En la inflamació crònica hi ha baixes concentracions de SP-D i, per tant, més susceptibilitat a patir malalties pulmonars infeccioses. Aleshores, l'SP-D podria ser un marcador d'inflamació, de resistència a la insulina i futura DM 2.

Les defensines s'han estudiat per la seva funció immunològica i per formar part de la resposta inflamatòria (Lehver R i Garz T, 2002). El seu interès també s'ha centrat en el fet que el gen d'algunes defensines presenta llocs d'unió per factors de transcripció involucrats en el *signaling* de la insulina (Froy O. i col., 2006). L'elevada concentració de glucosa i/o la deficiència d'insulina interfereixen en l'expressió d'algunes defensines dels TLR (Froy O. i col., 2006). I, de fet, s'ha observat una relació positiva entre la sensibilitat a la insulina i la concentració de les HNP-1-3 sèriques en aquest estudi. Les  $\alpha$ -defensines, també, s'uneixen al colesterol LDL i en regula la seva degradació (Higazi

AA. i col.; 2000); i s'ha volgut estudiar una possible relació de les defensines amb l'arteriosclerosi o l'augment del colesterol LDL en la diabetis amb aquestes proteïnes.

La visfatina s'ha estudiat per les funcions suposadament mimètiques a la insulina. S'ha observat una associació entre la visfatina i la insulinosекреció i també s'ha vist correlacionada amb mesures de la SRI en aquest estudi. En un futur interessa estudiar una possible relació de la visfatina amb el deteriorament de les cèl·lules  $\beta$ .

## **5.1. DISCUSSIÓ DELS RESULTATS DE LA 1ª PART**

Els resultats obtinguts en aquest estudi, recolzen la hipòtesi que la defensa contra infeccions corre en paral·lel amb el metabolisme de la glucosa en subjectes sans (Megia A. i col., 2004; i Fernández-Real JM. i col., 2003). Les principals troballes són que, ajustant per l'edat, l'IMC i l'estat de fumar, la concentració de SP-D circulant és diferent segons l'estat de tolerància a la glucosa: l'SP-D és significativament inferior en pacients DM 2. En subjectes amb intolerància a la glucosa s'han trobat fortes associacions entre l'SP-D sèrica i les concentracions de glucosa en dejú i després d'una presa de glucosa, la sensibilitat a la insulina i els paràmetres d'inflamació (Figura 4.1.5.). S'han pogut replicar aquests resultats en una mostra independent de subjectes en els quals l'SP-D circulant està negativament associada amb diferents variables metabòliques. De gran interès són dos estudis recents que mostren una relació inversa entre l'IMC i les concentracions circulants de SP-D (Sorensen GL. i col., 2006; i Zhao XM. i col., 2007).

També cal destacar les variacions paral·leles entre l'LBP sèrica i l'SP-D (Figura 4.1.6.). Es pot hipotetitzar que el mateix factor que permet l'increment de l'LBP sèrica fa disminuir les concentracions de SP-D. De fet, els lipopolisacàrids tenen molta ubiqüitat, estan presents en els aliments i l'aigua, en la pols de les cases (Michel OJ. i col., 1996) i en el fum de les cigarretes (Hasday JD. i col., 1999). Tant el fet de fumar (com a estímul inflamatori) com la concentració plasmàtica de TNFR2 estan positivament associats a la concentració sèrica de SP-D.

Fumar fa augmentar significativament la concentració sèrica de SP-D en individus amb tolerància normal a la glucosa o pacients DM 1 (Figura 4.1.2. i 4.1.3.), però, en canvi, això no s'observa en subjectes amb intolerància a la glucosa o amb DM 2. Aquest fet suggereix que l'acció normal de la insulina és necessària per augmentar l'SP-D sèrica

després d'un estímul inflamatori. De fet, els receptors d'insulina es troben en els pneumòcits tipus II (cèl·lules que produeixen SP-D), i la insulina fa augmentar la síntesi de surfactant en estudis *in vitro* (Shapiro DL. i col., 1986). En conills s'ha demostrat *in vitro* que els pneumòcits tipus II tenen receptors d'insulina a la seva superfície (Kaplan SA. i col., 1984). El *glucagon-like peptide 1* estimula la secreció d'insulina i també estimula la secreció de surfactant en els pneumòcits tipus II humans (Vara E. i col., 2001). Per corroborar aquesta hipòtesi s'han avaluat els efectes de la insulina en una línia cel·lular que produeix SP-D. En aquest experiment la insulina fa augmentar l'expressió i secreció de SP-D, i l'elevada glucosa perjudica aquesta acció insulínica.

El fet de fumar també permet diferenciar la concentració de l'SP-D sèrica d'acord amb el polimorfisme Met<sup>11</sup>Thr només en subjectes amb tolerància normal a la glucosa (Figura 4.1.7.). Els homozigots AA mostren més SP-D sèrica només si són fumadors. Aquestes diferències han estat atribuïdes en donadors de sang al polimorfisme *per se*, sense haver estat escollits pel fet de fumar (Leth-Larsen R. i col., 2005). Aquest polimorfisme del gen de l'SP-D s'ha observat que està associat a paràmetres del metabolisme de la glucosa en tots els subjectes estudiats (Figura 4.1.8.) i a la sensibilitat a la insulina en individus obesos i amb sobrepès.

De totes maneres, aquests resultats s'haurien d'interpretar amb cautela, donat que la mostra relativa és petita. Malgrat tot, s'han observat associacions similars entre aquest polimorfisme i l'IMC (en dones) i la resistència a la insulina (en homes) en la replicació de l'estudi (estudi amb població asturiana). A més a més, el polimorfisme Met<sup>11</sup>Thr podria ser un possible marcador d'un altre gen susceptible que podria ser la base de les associacions observades.

En aquest treball s'hipotetitza que una relativa manca de resposta de l'SP-D a l'exposició d'estímuls ambientals de forma repetida podria abocar a una inflamació crònica i resistència a la insulina en els homozigots GG.

Per comprovar si l'SP-D sèrica està sota la influència inflamatòria s'ha avaluat la resposta de l'SP-D sèrica després d'un tractament amb salicilats en subjectes obesos. En efecte, s'observa que alguns pacients obesos que reben salicilats presenten una disminució de les concentracions de SP-D (Figura 4.1.12.). Els individus obesos homozigots AA que tenen altes concentracions de SP-D degut al fet de fumar són els que presenten una davallada de la concentració de SP-D després d'un tractament amb antiinflamatoris. Aquests resultats suggereixen que la producció de SP-D està regulada a nivell transcripcional i dirigida per l'estat inflamatori en els homozigots AA però no en els G/-. Sorprenentment, en paral·lel, la glucosa sèrica disminueix significativament només en els homozigots AA després del tractament amb salicilats (Figura 4.1.11.). Aquest efecte de la davallada de la concentració sèrica de glucosa induïda per salicilats també es va observar en estudis previs en individus DM 2 (Hundal RS. i col., 2002).

Finalment, s'ha avaluat un possible mecanisme de l'associació entre l'SP-D i el metabolisme de la glucosa. S'ha observat una forta relació entre l'activitat insulina i la baixa concentració de SP-D (Figura 4.1.13.). La base s'extreu d'un article que mostra que l'SP-D és inactivada per les proteïnases sèriques dels neutròfils (*neutrophils serine proteinases*) (Hirche TO. i col., 2004). L'activitat insulina augmenta fins a 14.5 vegades en els neutròfils de pacients diabètics (Theiss WC. i col., 1984). S'han descrit diferents pèptids que han estat degradats per la insulina, com la insulina, l'IGF-I, l'IGF-II, el glucagó, el pèptid natriurètic atrial, el transformador del factor de creixement alfa (*transforming growth factor-alpha*), els factors amiloides i l'hemoglobina oxidada (Duckworth WC. i col., 1998). Podria ser que la insulina

degradés l'SP-D, però no se sap encara. No obstant, seria factible que un tercer factor faci augmentar l'activitat insulínasa i disminuir l'SP-D. De fet, algunes molècules amb activitat insulínasa (com la *protein disulfide isomerase*) sembla ser que controlen simultàniament la degradació d'insulina i el procés inflamatori (Higuchi T. i col., 2004).

Està descrit que el promotor del gen de l'SP-D conté dominis NF-IL-6. La IL-6 podria inhibir l'expressió de l'SP-D. Per això, en l'obesitat i la DM 2, estadis on hi ha elevades concentracions d'IL-6, hi hauria la tendència a la disminució de les concentracions de l'SP-D.

El lligam entre la inactivació de la insulina, el metabolisme de la glucosa i l'SP-D sèrica requereix més estudis.

Finalment, cal recordar que la glucosa és un lligand de l'SP-D (Persson A. i col., 1990). En ratolins, quan tenen concentracions elevades de glucosa s'inhibeix la funció de l'SP-D de neutralització dels virus (Reading PC. i col., 1998). Aquest fet s'ha observat en pacients diabètics (Koziel H. i col., 1995). És possible que en aquests pacients repetides infeccions virals donin inflamació i empitjorament del control metabòlic.

Per altra banda, és interessant fer referència que les concentracions de SP-A (l'altra proteïna del surfactant pulmonar estudiada) en el líquid amniòtic està disminuïda en la diabetis; i que el tractament dels explants de pulmó fetal amb insulina a dosis farmacològiques dona com a resultat una reducció de les concentracions d'ARNm de SP-A (Snyder JM. i col., 1988). Aquesta qüestió és important en el cas dels infants nascuts de mares diabètiques ja que presenten una incidència més elevada de síndrome d'insuficiència respiratòria (Robert MF. i col., 1976), i aquests fetus invariablement desenvolupen hiperinsulinèmia (resistència a la insulina) que, al seu torn, redueix la velocitat de maduració del pulmó del fetus. Això ha estat confirmat en un model de

rates diabètiques en gestació en les quals el desenvolupament de l'expressió de SP-A (i SP-B i SP-C) està significativament disminuït o retardat (Miakotina OL. i col., 1998).

En resum, els resultats d'aquest estudi suggereixen una acció mediada per la insulina al pulmó. L'SP-D estaria involucrada en la immunitat innata, la funció pulmonar, la inflamació i la resistència a la insulina. Aquests resultats suggereixen que la immunitat innata del pulmó podria ser un encreuament de la inflamació, l'obesitat i la resistència a la insulina.



## **5.2. DISCUSSIÓ DELS RESULTATS DE LA 2ª PART**

La principal funció del pulmó, i en concret de l'epiteli alveolar, és proporcionar una superfície extensa i prima per l'intercanvi de gasos. L'epiteli pulmonar també actua com a barrera de protecció de l'hoste contra agents forans inhalats procedents de l'ambient mitjançant la seva segregació, i controla la mobilitat de soluts i aigua contribuint, així, al manteniment del balanç del fluid pulmonar. L'epiteli pulmonar té també un paper actiu en el metabolisme de mediadors endògens i agents xenobiòtics i és capaç de regenerar-se i restaurar-se després d'un dany pulmonar. L'epiteli pulmonar de pulmons sans produeix secrecions complexes com la capa de mucus, un agent actiu de superfície (surfactant), i diferents proteïnes importants en la defensa de l'hoste (Robbins RA i Rennard SI, 1997; i Lubma RL. i col., 1996).

El surfactant pulmonar proporciona estabilitat alveolar, prevé el col·lapse alveolar, i facilita la bona funcionalitat pulmonar mitjançant el manteniment de la tensió superficial apropiada en la interfase aire-líquid de la superfície alveolar (Creuwels LAJM. i col., 1997; Katyal SL. i col., 1977; Veldhuizen RAW. i col., 1997; i Wright JR., 1997).

Les proteïnes surfactants provenen dels alvèols pulmonars procedents únicament de la secreció apical.

Quan la barrera alveolocapil·lar està danyada quantitats elevades d'aquestes proteïnes es filtren al torrent sanguini. Així, doncs, les concentracions circulants d'aquestes proteïnes reflecteixen canvis en la permeabilitat pulmonar i reflecteixen l'estat de la funció pulmonar (Hermans C i Bernard A, 1999).

Les concentracions elevades de SP-A poden ser degudes a un augment de la seva producció, una disminució de la seva distribució a teixits, un augment de les seves pèrdues, o una combinació de tots aquest mecanismes.

En aquest treball es descriu que, a part del fet de fumar, la intolerància a la glucosa i la resistència a la insulina també estan associades a les elevades concentracions de SP-A circulants. El fet de fumar augmenta la pèrdua de proteïnes i molècules pulmonars, tant a través de la producció de neuropèptids vasoactius (taquiquinines) induïda pel tabac i procedent dels nervis sensors de les vies respiratòries (Wu ZX i Lee LY, 1999), com crònicament a través de la destrucció prematura del teixit connectiu del parènquima pulmonar. S'ha descrit que les concentracions sèriques de SP-A habituals (fisiològiques) ajuden a la recuperació del dany pulmonar causat pel fet de fumar. En altres estudis s'ha afirmat prèviament que la concentració de SP-A sèrica és elevada en fumadors (Nomori H. i col., 1998; i Michel OJ. i col., 1996). Diferents factors podrien estar associats amb l'augment de l'SP-A en sèrum. Tal i com s'ha comentat en la discussió de la primera part, els lipopolisacàrids són molt ubics en la natura, i, per tant, els podem trobar en el menjar, en l'aigua, en la pols de les cases, (Martin TR, 2000; i Michel OJ. i col., 1996), en les cigarretes (Hasday JD. i col., 1999), i aquests LPS podrien ser l'estímul pel qual augmenten les concentracions de SP-A en els individus fumadors.

Per excloure la variabilitat produïda pel fet de fumar, i donada la relació entre la baixa capacitat vital i el risc de patir diabetis que és completament independent a l'exposició al tabac (i que és més gran en els subjectes que no han fumat mai) (Yeh HC. i col., 2005), s'han exclòs els individus fumadors en la resta d'anàlisis.

Diferents paràmetres que són indicadors de trastorns metabòlics (la glucosa i la insulina sèriques en dejú o després d'una presa (dosi) de glucosa, l'hemoglobina glicada, els triglicèrids en dejú i la resistència a la insulina) estan associats a l'SP-A circulant. En

models multivariants, l'associació entre l'SP-A sèrica i la sensibilitat a la insulina persisteixen després d'ajustar per l'IMC, el WHR, els triglicèrids en dejú, i la creatinina i la proteïna C-reactiva sèriques, en diferents models (Taula 4.2.3.). La contribució de la sensibilitat a la insulina a la variància de l'SP-A circulant és remarcable en subjectes amb intolerància a la glucosa (37-38% d'aquesta variància) (Taula 4.2.3.)). La manca d'associació entre l'SP-A i la proteïna C-reactiva en anàlisis multivariants (Taula 4.2.3.) suggereix que la inflamació generalitzada no contribueix significativament en l'augment de la concentració de l'SP-A.

Com s'ha comentat anteriorment, els receptors de la insulina estan presents en els pneumòcits tipus II de conills (Kaplan SA. i col., 1984), i la insulina fa augmentar la síntesi de surfactant en estudis *in vitro* (Shapiro DL. i col., 1986). El *glucagon-like peptide 1*, conegut perquè estimula la secreció d'insulina, també induïx la secreció de surfactant en els pneumòcits tipus II humans (Vara E. i col., 2001).

En altres estudis amb models de rata amb diabetis gestacional, el tractament amb insulina en els últims dies de l'embaràs ha donat com a resultat un augment important de les concentracions d'ARNm de l'SP-A respecte les rates amb diabetis gestacional no tractades (Moglia BB i Phelps DS, 1996). Podria ser que les concentracions d'insulina elevades observades en la resistència a la insulina participessin en l'increment de la producció de SP-A i en la seva distribució des d'aquestes cèl·lules (pneumòcits tipus II).

No es pot descartar que altres factors associats a la resistència a la insulina i a la intolerància a la glucosa assoleixin aquest paper. Sugahara K. i col·laboradors (1992 i 1994) van estudiar l'ARNm de l'SP-A, en rates amb diabetis induïda per l'estreptozotocina, mitjançant hibridació *in situ* utilitzant una sonda específica (*probe*) d'ADNc de rata. La senyal immunohistoquímica (*immunohistostaining*) de l'SP-A en pulmons de rates diabètiques era dèbil en les cèl·lules alveolars tipus II. Però,

mitjançant autoradiografies de la hibridació *in situ*, s'observava un gran nombre de grànuls de plata d'ARNm de SP-A tant en cèl·lules alveolars tipus II com en cèl·lules Clara procedents de pulmons de rates diabètiques comparat amb els pulmons de rates control. Aquests resultats es confirmaren mitjançant la mesura de la concentració de SP-A i mitjançant *northern blot* (Sugahara K. i col., 1992). En un altre estudi dels mateixos autors s'observà que la quantitat relativa de grànuls de plata d'ARNm de SP-A era dues vegades més gran en les cèl·lules epitelials dels bronquis de pulmons de rates diabètiques que en les rates control (Sugahara K. i col., 1994).

Aquestes troballes *in vivo* contrasten amb les observacions *in vitro*. En explants de pulmó de fetus de rata, no s'observen alteracions en el contingut d'ARNm de SP-A quan es cultiven a diferents concentracions de glucosa (10, 25, 50 o 100 mM) (Rayani HH. i col., 1999). A més, la insulina a dosis farmacològiques inhibeix l'expressió del gen de l'SP-A *in vitro* (Miakotina OL. i col., 1998; i Dekowski SA i Snyder JM, 1992).

Els subjectes obesos tenen una concentració sèrica de SP-A significativament més elevada. En rates a les quals se'ls ha induït obesitat a través de la dieta (aliments rics en greixos) s'han descrit alteracions en la funció pulmonar i en les proteïnes i lípids del surfactant (Inselmans LS. i col., 2004). Les concentracions (en grans agregats) de la fosfatidilcolina disaturada i de SP-A i SP-B són més elevades en rates obeses (obesitat induïda per aliments rics en greixos) que en rates control. Els autors d'aquest estudi especulen que el dipòsit de lípids a nivell intrapulmonar i una possible deficiència de surfactant a la superfície de l'àrea alveolar podrien contribuir a la reducció del bon funcionament pulmonar en les rates obeses (Inselmans LS. i col., 2004). Això podria confirmar que l'obesitat és el factor més important que determina l'augment de la concentració de SP-A, degut a la relació que s'observa entre l'IMC i el WHR en tots els

grups. L'obesitat, amb totes les seves possibles implicacions, és a dir, la hipòxia crònica, podria ser considerada la força que desencadena el procés. No obstant, quan es realitzen les anàlisis multivariants (només IMC, WHR i sensibilitat a la insulina), només la sensibilitat a la insulina presenta una contribució independent a l'SP-A circulant.

Les bases d'aquest estudi són la recollida de dades d'uns subjectes escollits a l'atzar i l'ús de les mesures de la sensibilitat a la insulina (*minimal model*). Les limitacions de l'estudi inclouen la manca de tests de funció pulmonar. Les dades referents a l'exposició indirecta al fum mitjançant la mesura de les concentracions de cotinina b podien haver servit. També hagués estat d'utilitat comprovar si les concentracions de SP-A sèriques servien com a marcador d'apnea del son en subjectes obesos.

Finalment, l'augment de l'SP-A circulant podria ser un reflex de la disminució de l'SP-A en altres teixits. Cal destacar, en aquest sentit, que les concentracions de SP-A en el fluid amniòtic són baixes en les dones diabètiques (Snyder JM. i col., 1988). També és important tenir en compte que els infants nascuts de mares diabètiques tenen una elevada incidència de la síndrome d'insuficiència respiratòria.

En resum, la proteïna pulmonar SP-A circulant està associada amb la intolerància a la glucosa i la resistència a la insulina.



### **5.3. DISCUSSIÓ DELS RESULTATS DE LA 3ª PART**

Les  $\alpha$ -defensines estan relacionades amb dos factors de risc cardiovascular modificables: l'obesitat i el fet de fumar. Una associació inversa (negativa) és força evident en subjectes sans. A més les  $\alpha$ -defensines estan inversament relacionades amb el colesterol total i el colesterol LDL en sèrum i directament relacionades amb la vasodilatació en resposta a l'alliberació d'òxid nítric (NO).

Les  $\alpha$ -defensines són proteïnes abundants, que comprenen la meitat de les proteïnes dels grànuls atzuròfils i un 5% del total de proteïnes dels neutròfils humans (De Smet K. i col., 2005). Encara que les seves concentracions en plasma són baixes, poden arribar a concentracions de micromolar en pacients amb sèpsia o amb meningitis bacteriana (Panyutich AV. i col., 1993). A excepció d'aquest augment de les  $\alpha$ -defensines en resposta a les infeccions bacterianes (semblant a la resposta que indueix la mobilització dels pèptids emmagatzemats dins els fagòcits en resposta a productes bacterians), la seva regulació *in vivo* és pràcticament desconeguda. De fet, es considera que l'expressió de les  $\alpha$ -defensines és constitucional sota condicions normals. Això contrasta amb les  $\beta$ -defensines, l'expressió de les quals està regulada tant per productes bacterians com per citocines proinflamatòries (Selsted ME. i col., 2005).

Les dades d'aquest estudi, en primer lloc, suggereixen que l'obesitat i el fet de fumar contribueixen en la disminució de la concentració circulant de les DEFA 1-3. En aquest sentit, el departament (UDEN: Unitat de Diabetis, Endocrinologia i Nutrició) va publicar un estudi on s'observà que l'obesitat està associada a una disminució de la BPI (*bactericidal/permeability-increasing protein*), un antibiòtic natural que també es troba als grànuls atzuròfils dels neutròfils (Gubern C. i col., 2006).

A part del rol de defensa contra els microorganismes invasors, sembla ser que les DEFA 1-3 són moduladores del metabolisme dels lípids i de la funció vascular. Aquest és, doncs, el primer estudi que relaciona clínicament les DEFA 1-3 amb els lípids sèrics i la reactivitat vascular. S'ha observat una deficiència de les  $\alpha$ -defensines associada a un perfil de lípids més aterogènic (que provoquen arteriosclerosi). La disminució de les  $\alpha$ -defensines també s'associa a una resposta vasomotora més pobre als vasodilatadors endoteliindependents, que és un factor de risc independent per l'arteriosclerosi (Adams MR. i col., 1998). Encara que el grau d'associació de les DEFA 1-3 amb cada variable d'aquest estudi és relativament baix, se sap que els factors de risc de l'arteriosclerosi tendeixen a anar junts, i, així, petits efectes individuals poden ser clínicament rellevants si van junts.

Les dades d'aquest estudi concorden amb les dades de Higazi AA. i col·laboradors que expliquen que les  $\alpha$ -defensines es poden unir a partícules de LDL (Higazi AA. i col., 2000), per interactuar tant amb el receptor de l'LDL com amb la *LDL-receptor-related protein/ $\alpha$ 2-macroglobulin receptor* (Higazi AA. i col., 2000; i Nassar T. i col., 2002), i per afavorir la captació i la degradació de les partícules de LDL en les cèl·lules vasculares (Higazi AA. i col., 2000). Aquests resultats també concorden amb les dades dels mateixos investigadors que mostren que les  $\alpha$ -defensines poden unir-se a l'*LDL-receptor-related protein/ $\alpha$ 2-macroglobulin receptor* a les cèl·lules de la musculatura llisa i inhibir la contracció de la musculatura llisa induïda per la fenilafrina dels anells aòrtics de rata (Nassar T. i col., 2002).

Una possible interpretació de les dades obtingudes fins ara és que les  $\alpha$ -defensines poden induir el catabolisme del colesterol LDL i millorar el to vascular *in vivo*, i que la disminució de la producció d'aquests pèptids en els neutròfils d'individus obesos i d'individus fumadors pot provocar una deficiència funcional d'aquests pèptids (Gubern

C. i col., 2006; i MacNee W. i col., 1989). No obstant, també es podrien trobar arguments per rols de les DEFA 1-3 oposats als descrits respecte al metabolisme del colesterol i la reactivitat vascular; i no es pot excloure la possibilitat que la disminució observada de les DEFA 1-3 en els subjectes obesos i els subjectes fumadors pot respondre a un augment de l'acumulació d'aquests pèptids a la paret vascular.

Durant aquestes investigacions s'han publicat estudis que descriuen que la concentració de les  $\alpha$ -defensines és més elevada en les artèries arterioscleròtiques humanes *vs.* les normals (Barnathan ES. i col., 1997; i Higazi AA. i col., 1997). S'ha demostrat que les  $\alpha$ -defensines inhibeixen els efectes fibrinolítics de l'activador del plasminogen tissular (Higazi AA. i col., 1996) i la dilatació vascular en resposta a la bradicinina (Kougias P. i col., 2006). Basat en aquestes observacions s'ha proposat que les  $\alpha$ -defensines poden exercir accions perjudicials en la vascularització (Higazi AA. i col., 2000).

Les condicions experimentals d'aquests estudis *in vitro* (concentracions de les  $\alpha$ -defensines suprafisiològiques *vs.* concentracions fisiològiques, característiques tissulars o cel·lulars, i reactius i tècniques utilitzades) podrien ser responsables d'alguns dels efectes paradoxals evidents de les  $\alpha$ -defensines descrits fa temps. Algunes de les funcions sobre vascularització aparentment oposades d'aquests pèptids recorden a les funcions de l'activador del plasminogen tissular, el qual causa una vasodilatació a baixes concentracions i una vasoconstricció a concentracions altes (Nassar T. i col., 2004).

Pel què fa als mecanismes que relacionen les  $\alpha$ -defensines amb els paràmetres metabòlics i amb la reactivitat vascular, pot haver-hi una contribució de les isoformes de la proteïna quinasa C (PKC). La proteïna quinasa C és una diana de les  $\alpha$ -defensines, i la PKC està involucrada en la cascada de senyalització de la insulina, en el metabolisme

del colesterol i en la funció vascular (Nassar T. i col., 2002; Mehta KD. i col., 2002; i Rask-Madsen C. i col., 2005).

En resum, les  $\alpha$ -defensines circulants estan associades amb el colesterol sèric i la reactivitat vascular en humans. Les  $\alpha$ -defensines poden tenir implicacions clíniques tant en pacients amb hipercolesterolèmia com amb disfunció vascular. Malgrat tot, cal fer més estudis amb models experimentals de dislipidèmia i arteriosclerosi i amb pacients amb aquestes malalties.

## **5.4. DISCUSSIÓ DELS RESULTATS DE LA 4<sup>a</sup> PART**

Aquest és el primer estudi fet sobre concentracions de visfatina en sèrum i disfunció de les cèl·lules  $\beta$ .

S'ha demostrat que la visfatina juga un paper en la millora de la hiperglucèmia en dos models animals diferents de diabetis (Fukuhara A. i col., 2005). Tant la sobreexpressió del gen de la visfatina com el tractament amb la proteïna recombinant exerceixen uns efectes de disminució de la concentració de glucosa en sang en ratolins diabètics. La visfatina recombinant és igual de potent que la insulina exògena en aquest efecte. Per donar suport a aquests resultats, es va deletar una de les dues còpies del gen de la visfatina i es va comprovar que causa defectes en la tolerància a la glucosa en ratolins (Fukuhara A. i col., 2005). Aquests resultats, junt amb les concentracions elevades de visfatina en sèrum observades en DM 2 tan en ratolins com en humans (Fukuhara A. i col., 2005; i Chen MP. i col., 2006), suggereixen un paper potencial rellevant d'aquesta adipocitoquina en la patogènesi o el fenotip clínic de la DM 2.

Recents esforços per aclarir el paper de la visfatina en aquesta malaltia no han aconseguit descriure una associació entre aquesta adipocitoquina i la sensibilitat a la insulina (Berndt J. i col., 2005; i Chen MP. i col., 2006). Així s'han trobat relacions inconsistentes entre la visfatina i les mesures antropomètriques i bioquímiques relacionades amb la resistència a la insulina, com l'IMC, el perímetre de la cintura, el greix abdominal, la insulina en dejú, la HOMA-RI o l'adiponectina en sèrum, en diferents estudis (Hammarstedt A. i col., 2006; i Haider DG. i col., 2006). Però el fenotip de la DM 2 requereix també un defecte en la funció de les cèl·lules  $\beta$  (DeFronzo RA, 1988), la qual cosa, aparentment, s'ha passat per alt en investigacions prèvies.

És poc probable que la insulina reguli directament les concentracions de visfatina en sèrum (ja que no es descriuen efectes en la síntesi de visfatina després de tractar

cèl·lules 3T3-L1 amb insulina (Kralisch S. i col., 2005)), no s'observen canvis en la concentració plasmàtica de visfatina entre el dejú i després de la ingesta en ratolins (Fukuhara A. i col., 2005), i no es veuen diferències de la visfatina en sèrum en pacients amb DM 2 tractats amb sulfonilurees o insulina exògena (Chen MP. i col., 2006). Els resultats que es mostren en aquesta tesi suggereixen, però, l'existència d'un mecanisme fisiopatològic lligat a la disfunció de les cèl·lules  $\beta$  que causa l'augment de la visfatina circulant en la DM 1 i la DM 2. A part de l'associació negativa amb l'AIRg procedent de FSIGT, la visfatina en sèrum també està correlacionada negativament amb la insulina als 30-min de l'OGTT (substitut de l'índex de secreció d'insulina) en aquest estudi. A més a més, es va demostrar anteriorment que la concentració de visfatina en sèrum disminueix després de la pèrdua de pes en individus amb obesitat mòrbida (Guldstrand M. i col., 2003). Cal destacar que aquesta intervenció millora la funció de les cèl·lules  $\beta$  en obesos mòrbids (Camastra S. i col., 2005). Les dades obtingudes en aquesta tesi suggereixen que aquest mecanisme no és actiu en les primeres fases de deteriorament de les cèl·lules  $\beta$ , ja que tant els subjectes amb intolerància a la glucosa com els DM 2 de diagnòstic recent no tenen augmentades les concentracions de visfatina en sèrum en aquest estudi. Es necessita, per tant, un defecte més sever, com l'observat en una diabetis de llarga evolució, per alterar la visfatina circulant. Cal destacar, també, que aquest mecanisme proposat sembla invalidar l'efecte inhibitori que sobre l'expressió de la visfatina tenen les citoquines inflamatòries sobrerregulades en la diabetis, com el TNF- $\alpha$  i la IL-6 (Fernández-Real JM. i col., 2003; i Kralisch S. i col., 2005).

La visfatina circulant està també altament correlacionada amb l'HbA1c en pacients amb DM 2. Tot i que factors relacionats amb la hiperglucèmia o l'estrès oxidatiu poden explicar, en part, l'associació entre la visfatina i la diabetis, el fet que aquesta diferència persisteixi en els pacients amb DM 2 de llarga evolució i en la DM 1 indica que altres

factors, a part de la hiperglucèmia, estan involucrats en aquesta relació. Per altra banda, l'elevada HbA1c reflectiria una disfunció més severa de les cèl·lules  $\beta$  (Yki-Jarvinen H, 1992), per això, a l'ajustar per aquest factor disminueix l'associació entre la visfatina circulant i la diabetis tipus 2.

Per altra banda, existeix la possibilitat que els resultats obtinguts en aquest treball s'expliquin per l'acció d'hormones contrareguladores de la insulina. L'hormona de creixement i les catecolamines són reguladors negatius de l'expressió de visfatina. Els glucocorticoides indueixen la secreció de visfatina en adipòcits (Kralisch S. i col., 2005), i així podria contribuir a augmentar les concentracions d'aquesta adipocitoquina. És possible també que altres hormones de l'eix enteroinsular causin l'augment de la visfatina en sèrum al llarg del deteriorament de les cèl·lules  $\beta$ .

En humans també s'espera que la visfatina tingui la funció mimètica a la insulina, com en animals experimentals, i així l'augment de la concentració de visfatina en sèrum pot respondre a un mecanisme compensatori per millorar les conseqüències funcionals de la deficiència d'insulina. L'augment de la concentració de visfatina pot promoure, també, la sensibilitat a la insulina mitjançant els seus efectes estimuladors sobre l'expressió dels gens del PPAR- $\gamma$  i de l'adiponectina (Fukuhara A. i col., 2005). En pacients diabètics no s'exclou ni una possible insensibilitat a les accions de la visfatina ni una contribució de la visfatina al deteriorament de les cèl·lules  $\beta$ .

Cal considerar un estudi recent, publicat després d'aquest treball, que comprova que la visfatina (Nampt: nicotinamida fosforibosiltransferasa) té una activitat enzimàtica intra- i extracel·lular biosintètica de NAD (nicotinamida adenina dinucleòtid). Seria la

visfatina la que tindria un efecte sobre la secreció d'insulina i no a l'inversa (Revollo JR. i col., 2007).

Han observat que la forma extracel·lular de Nampt (eNampt) no mostra efectes mimètics a la insulina *in vitro* o *in vivo* però té una activitat biosintètica de NAD superior a la forma intracel·lular (iNampt) (Revollo JR. i col., 2007).

Han comprovat que la deficiència o inhibició química de Nampt causa defectes en la biosíntesi de NAD i en la secreció d'insulina estimulada per la glucosa en els illots pancreàtics tant *in vivo* com *in vitro*, i intolerància a la glucosa en ratolins (Revollo JR. i col., 2007). Aquests defectes es corregeixen amb l'administració de NMN (*nicotinamide mononucleotide*), que és un producte de la reacció de Nampt, és a dir, un precursor de NAD (Revollo JR. i col., 2007).

En aquest estudi es suggereix que la biosíntesi de NAD sistèmic mediada per Nampt és essencial pel bon funcionament de les cèl·lules  $\beta$ , i conclouen que és una molècula vital per la regulació de l'homeòstasi de la glucosa.

Els adipòcits són les cèl·lules que modifiquen i secreten Nampt durant el seu procés de diferenciació. En certes condicions fisiopatològiques que causen canvis significatius en la massa del teixit adipós, com l'obesitat i la diabetis tipus 2, el teixit adipós pot secretar més eNampt. I s'ha demostrat que les concentracions circulants d'eNampt incrementen en l'hiperglucèmia (Haider DG. i col., 2006a). I, per tant, el teixit adipós podria regular el funcionament de la cèl·lula  $\beta$  mitjançant la secreció d'eNampt i la biosíntesi extracel·lular de NMN.

Aquests autors també creuen que l'alteració de la concentració de NAD pot alterar l'activitat d'enzims de les vies metabòliques de la glicòlisi o l'oxidació dels àcids grassos en les cèl·lules  $\beta$  (Revollo JR. i col., 2007).

En resum, segons aquest treball la visfatina circulant augmenta amb el progressiu deteriorament de les cèl·lules  $\beta$ . L'estudi de la regulació i el paper de la visfatina en la diabetis mellitus mereix consideracions futures.



## **6. CONCLUSIONS**

## CONCLUSIONS

---

1. La concentració de SP-D circulant està correlacionada amb variables de la síndrome metabòlica i inflamació.
  - a. i. L'associació entre l'SP-D circulant i paràmetres de la síndrome metabòlica, com la sensibilitat a la insulina, és més significativa en subjectes amb intolerància a la glucosa.
  - ii. La glucosa en dejú (en tots els subjectes en general i sobretot en els intolerants a la glucosa) contribueix a la variància de l'SP-D.
  - b. La concentració de SP-D és inferior en individus amb DM 2 i obesos.
  - c. La concentració de SP-D varia segons l'estat d'inflamació.
  - d. La presa d'antiinflamatoris tendeix a estar associada a una disminució de la concentració sèrica de SP-D.
2. Hi ha una relació entre l'SNP Met<sup>11</sup>Thr i la concentració sèrica de SP-D dependent de l'estat del fumar (tabaquisme).
3. S'ha observat una correlació entre la variació dels paràmetres de la síndrome metabòlica i de la inflamació i els al·lels de l'SNP Met<sup>11</sup>Thr.
4. *In vitro* la insulina fa augmentar l'expressió i secreció de SP-D, i una elevada quantitat de glucosa perjudica aquesta acció insulínica.

L'SP-D podria estar implicada en la inflamació i la resistència a la insulina, a part de les funcions immunitàries i pulmonars que se li assignen.

5. La concentració de SP-A circulant està correlacionada amb variables de la síndrome metabòlica i de la inflamació.
  - a. i. Els subjectes obesos tenen concentracions sèriques de SP-A significativament més elevades.

- ii. Els individus intolerants a la glucosa (IGT i DM 2) presenten concentracions més elevades de SP-A sèrica que els normotolerants.
- b. i. Diferents paràmetres que són indicadors de trastorns metabòlics estan associats a l'SP-A circulant.
- ii. La contribució de la sensibilitat a la insulina a la variància de l'SP-A circulant és remarcable en subjectes amb intolerància a la glucosa.
- iii. La inflamació generalitzada sembla no contribuir significativament en l'augment de la concentració de SP-A sèrica.

L'SP-A circulant està associada amb la intolerància a la glucosa i la resistència a la insulina.

- 6. a. L'obesitat i el fet de fumar contribueixen en la disminució de la concentració de les HNP 1-3 circulants.
- b. Hi ha una relació positiva entre la sensibilitat a la insulina i la concentració de les HNP 1-3 sèriques.
- 7. a. Hi ha una relació negativa entre la concentració de colesterol total i colesterol LDL amb la concentració circulant de les HNP 1-3.
- b. S'observa un increment de la vasodilatació endoteliindependent en els pacients amb valors de HNP 1-3 circulants superiors a la mitjana de la població estudiada.

Les HNP 1-3 podrien ser moduladores del metabolisme dels lípids (podrien afavorir la captació i la degradació de les partícules de LDL) i de la funció vascular (milloren el to vascular *in vivo*).

8. Els individus amb una DM 2 de llarga evolució i els DM 1 presenten més concentració de visfatina circulant que els DM 2 de diagnòstic recent o els no DM.
9. La concentració de visfatina està correlacionada amb paràmetres de secreció i sensibilitat a la insulina.

La visfatina podria tenir una activitat compensatòria a la resistència a la insulina.



## **7. BIBLIOGRAFIA**

## BIBLIOGRAFIA

---

- Adams MR, Robinson J, McCredie R, Seale JP, Sorensen KE, Deanfield JE, Celermajer DS: Smooth muscle dysfunction occurs independently of impaired endothelium-dependent dilation in adults at risk of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*, 32: 123-127, 1998.
- Aderibigbe AO, Thomas RF, Mercer RR, Auten Jr RL: Brief exposure to 95% oxygen alters surfactant protein D and mRNA in adult rat alveolar and bronchiolar epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 20: 219-227, 1999.
- Afonina I, Zivarts M, Kutuyavin I, Lukhtanov E, Gamper H, Meyer RB: Efficient priming of PCR with short oligonucleotides conjugated to a minor groove binder. *Nucleic Acids Res*, 25: 2657-2660, 1997.
- Aguirre V, Uchida T, Yenush L, Davis R, White MF: The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). *J Biol Chem*, 275: 9047-9054, 2000.
- Aguirre V, Werner ED, Giraud J, Lee YH, Shoelson SE, White MF: Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action. *J Biol Chem*, 277: 1531-1537, 2002.
- Allen MJ, Voelker DR, Mason RJ: Interactions of surfactant proteins A and with *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus fumigatus*. *Immunol*, 69: 2037-2044, 2001.
- Al-Salmi QA, Walter JN, Colasurdo GN, Sockrider MM, Smith EO, Takahashi H, Fan LL: Serum IL-6 and surfactant proteins A and D in pediatric interstitial lung disease. *Chest*, 127: 403-407, 2005.
- Altshuler D, Hirschhorn JN, Klannemark M, Lindgren CM, Vohl MC, Nemesh J, Lane CR, Schaffner SF, Bolk S, Brewer C, Tuomi T, Gaudet D, Hudson TJ, Daly M, Groop L, Lander ES: The common PPARgamma Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes. *Nat Genet*, 26: 76-80, 2000.
- American Diabetes Association: Standards of Medical Care in Diabetes. *Diabetes Care*, 31: S12-S54, 2008a.
- American Diabetes Association: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 31: S55-S60, 2008b.
- Anderson EA, Hoffman RP, Balon TW, Sinkey CA, Mark AL: Hyperinsulinemia produces both sympathetic neural activation and vasodilation in normal humans. *J Clin Invest*, 87: 2246-2252, 1991.
- 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, Matsuzawa Y: Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun*, 27: 79-83, 1999.
- Arner P: Visfatin-A true or false trail to type 2 Diabetes Mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*, 91: 28-30, 2006.

- Ashitani J, Mukae H, Hiratsuka T, Nakazato M, Kumamoto K, Matsukura S: Plasma and BAL fluid concentration of antimicrobial peptides in patients with *Mycobacterium avium*-intracellulare infection. *Chest*, 4: 1131-1137, 2001.
- Bachurski CJ, Ross GF, Ikegami M, Kramer BW, Jobe AH: Intra-amniotic edotoxin increases pulmonary surfactant proteins and induces SP-B processing in fetal sheep. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 280: L279-L285, 2001.
- Bagdade JD: High-density lipoprotein transport in diabetes mellitus. In Draznin B, Eckel RH (eds) *Diabetes and atherosclerosis. Molecular basis and clinical aspects*. New York: Elsevier, 59-76, 1993.
- Bahtiyar G, Shin JJ, Aytaman A, Sowers JR, McFarlane SI: Association of diabetes and hepatitis C infection: epidemiologic evidence and pathophysiologic insights. *Curr Diab Rep*, 4: 194-198, 2004.
- Baker EH, Wood DM, Brennan AL, Clark N, Baines DL, Philips BJ: Hyperglycemia and pulmonary infection. *Proceedings of the Nutrition Society*, 65: 1-9, 2006.
- Ballard PL, Liley HG, Gonzales LW, Odom MW, Ammann AJ, Benson B, White RT, Williams MC: Interferon- $\gamma$  and synthesis of surfactant components by cultured human fetal lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2: 137-143, 1990.
- Bals R: Epithelial peptides in host defense against infection. *Respir Res*, 1: 141-150, 2000.
- Barnathan ES, Raghunath PN, Tomaszewski JE, Ganz T, Cines DB, Higazi Aa-R. Immunohistochemical localization of defensin in human coronary vessels. *Am J Pathol*, 150: 109-1020, 1997.
- Barroso I: Genetics of Type 2 diabetes. *Diabetic Medicine*, 22: 517-535, 2005.
- Barker DJ, Godfrey KM, Fall C, Osmond C, Winter PD, Shaheen SO: Relation of birth weight and childhood respiratory infection to adult lung function and death from chronic obstructive airways disease. *BMJ*, 303:671-675, 1991.
- Barr FE, Pedigo H, Johnson TR, Shepherd VL: Surfactant protein A enhances uptake of respiratory syncytial virus by monocytes and U937 macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 23: 586-592, 2000.
- Basu S, Binder RJ, Ramalingam T, Srivastava PK: CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. *Immunity*, 14: 303-313, 2001.
- Bates SR, Gonzalez LW, Tao JQ, Rueckert P, Ballard PL, Fisher AB: Recovery of rat type II cell surfactant components during primary cell culture. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 282: L267-L276, 2002.
- Bauer F, Schweimer K, Klüver E, Conejo-Garcia JR, Forssmann WG, Rösch P, Adermann K, Sticht H: Structure determination of human and murine beta-defensins reveals structural conservation in the absence of significant sequence similarity. *Protein Sci*, 10: 2470-2479, 2001.
- Benne CA, Kraaijeveld CA, van Strijp JA, Brouwer E, Harmsen M, Verhoef J, van Golde LM, van Iwaarden JF: Interactions of surfactant protein A with influenza A viruses: binding and neutralization. *J Infect Dis*, 171: 335-341, 1995.

- Bensch K, Raida M, Magert H-J, Schulz-Knappe P, Forssmann WG: HBD-I: a novel  $\beta$ -defensin from human plasma. *FEBS Lett*, 368: 331-335, 1995.
- Benson SC, Pershadsingh HA, Ho CI, Chittiboyina A, Desai P, Pravenec M, Qi N, Wang J, Avery MA, Kurtz TW: Identification of Telmisartan as a Unique Angiotensin Receptor Antagonist with Selective PPAR $\gamma$ -Modulation Activity. *Hypertension*, 43: 993-1002, 2004.
- Berg AH, Combs TP, Du X, Brownlee M, Scherer PE: The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med*, 7: 947-953, 2001.
- Bergman RN: Toward physiological understanding of glucose tolerance. Minimal-model approach. *Diabetes*, Lilly lecture 1989, 38. 1512-1527, 1989.
- Berndt J, Kloting N, Kralisch S, Kovacs P, Fasshauer M, Schon MR, Stumvoll M, Bluher M: Plasma visfatin concentrations and fat depot-specific mRNA expression in humans. *Diabetes* 54: 2911-2916, 2005.
- Betsuyaku T, Kuroki Y, Nagai K, Nasuhara Y, Nishimura M: Effects of ageing and smoking on SP-A and SP-D levels in bronchoalveolar lavage fluid. *Europ Respir J*, 24: 964-970, 2004.
- Binder RJ, Han DK, Srivastava PK: CD91: a receptor for heat shock protein gp96. *Nat Immunol*, 1: 151-155, 2000.
- Binder RJ, Vatner R, Srivastava PK: The heat-shock protein receptors: come answers and more questions. *Tissue Antigens*, 64: 442-451, 2004.
- Biragyn A, Ruffini PA, Leifer CA, Klyushnenkova E, Shakhov A, Chertov O, Shirakawa AK, Farber JM, Segal DM, Oppenheim JJ, Kwak LW: Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by  $\beta$ -defensin 2. *Science*, 298: 1025-1029, 2002.
- Birchsler T, Reinhart S, Büchner K, Loeliger S, Reinhard S, Hossle P, Aguzzi A, Launer R: Human toll-like receptor mediates induction of the antimicrobial peptide human beta-defensin 2 in response to bacterial lipoprotein. *Eur J Immunol*, 31: 3131-3137, 2001.
- Bjorntorp P i Rosmond R: Neuroendocrine abnormalities in visceral obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 24 Suppl 2: S80-S85, 2000.
- Boden G: Fatty acid-induced inflammation and insulin resistance in skeletal muscle and liver. *Curr Diab Rep*, 6(3): 177-181, 2006.
- Boggaram V, Smith ME, Mendelson CR: Posttranscriptional regulation of surfactant protein A messenger RNA in human fetal lung in vitro by glucocorticoids. *Mol Endocrinol*, 5: 414-423, 1991.
- Boggaram V: Regulation of lung surfactant protein gene expression. *Front Biosci*, 8: d751-d764, 2003.
- Bolinder J, Kager L, Östman J, Arner P: Differences at the receptor and postreceptor levels between human omental and subcutaneous adipose tissue in the action of insulin on lipolysis. *Diabetes*, 32: 117-129, 1983.
- Boman HG: Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu Rev Immunol*, 13: 61-92, 1995.

- Bonadonna RC, Groop L, Kraemer N, Ferrannini E, Del Prato S, DeFronzo RA: Obesity and insulin resistance in humans: a dose-response study. *Metabolism*, 39: 452-459, 1990.
- Borron PJ, Crouch EC, Lewis JF, Wright JR, Possmayer F, Fraher LJ: Recombinant rat surfactant-associated protein D inhibits human T lymphocyte proliferation and IL-2 production. *J Immunol*, 161: 4599-4603, 1998.
- Böttcher Y, Teupser D, Enigk B, Berndt J, Klötting N, Schön MR, Thiery J, Blüher M, Stumvoll M, Kovacs P: Genetic Variation in the Visfatin Gene (*PBEF1*) and Its Relation to Glucose Metabolism and Fat-Depot-Specific Messenger Ribonucleic Acid Expression in Humans. *J Clin Endocrinol Metab*, 91: 2725-2731, 2006.
- Bouchard C, Tremblay A, Despres JP, Nadeau A, Lupien PJ, Theriault G, Dussault J, Moorjani S, Pinault S, Fournier G: The response to long-term overfeeding in identical twins. *N Engl J Med*, 322: 1477-1482, 1990.
- Bouloumié A, Sengenès C, Portolan G, Galitzky J, Lafontan M: Adipocyte produces matrix metalloproteinases 2 and 9: involvement in adipose differentiation. *Diabetes*, 50: 2080-2086, 2001.
- Brand R, Schorr U, Kunz I, Kertmen E, Ringel J, Distler A, Sharma AM: Tumor necrosis factor alpha -308 G/A polymorphism in obese caucasians. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 25: 581-585, 2001.
- Bratusch-Marrain PR, Komjati M, Waldhausl WK: Efficacy of pulsatile versus continuous insulin administration on hepatic glucose production and glucose tolerance through increased fat-free mass. *Diabetologia*, 48: 1841-1843, 2005.
- Braun B, Rock PB, Zamudio S, Wolfel GE, Mazzeo RS, Muza SR, Fulco CS, Moore LG, Butterfield GE: Women at altitude: short-term exposure to hypoxia and/or alpha(1)-adrenergic blockade reduces insulin sensitivity. *J Appl Physiol*, 91: 623-631, 2001.
- Bridges JP, Davis HW, Damodarasamy M, Kuroki Y, Howles G, Hui DY, McCormack FX: Pulmonary surfactant proteins A and D are potent endogenous inhibitors of lipid peroxidation and oxidative cellular injury. *J Biol Chem*, 275: 38848-38855, 2000.
- Brinker KG, Garner H, Wright JR: Surfactant protein A modulates the differentiation of murine bone marrow-derived dendritic cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 284: 232-241, 2001.
- Brinker KG, Martin E, Borron P, Mostaghel E, Doyle C, Harding CV, Wright JR: Surfactant protein D enhances bacterial antigen presentation by bone marrow-derived dendritic cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 281: L1453-L1463, 2001.
- Broedl UC i Göke B: Molekulare Diagnostik des Diabetes mellitus. *Neue diagnostische Verfahren*, 47: 47-54, 2006.
- Brown-Augsburger P, Hartshorn K, Chang D, Rust K, Fliszar C, Welgus HG, Crouch EC: Site-directed mutagenesis of Cys-15 and Cys-20 of pulmonary surfactant protein D. Expression of a trimeric protein with altered anti-viral properties. *J Biol Chem*, 271: 13724-13730, 1996.

- Bry K, Lappalainen U, Hallman M: Intaamniotic interleulin-1 accelerates surfactant protein synthesis in fetal rabbits and improves lung stability after premature birth. *J Clin Invest*, 99(12): 2992-2999, 1997.
- Buch CB. i col: Human  $\alpha$ -defensins block papillomavirus infection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103: 1516-1521, 2006.
- Cabana VG, Siegel JN, Sabesin SM: Effects of the acute phase response on the concentration and density distribution of plasma lipids and apolipoproteins. *J Lipid Res*, 30: 39-49, 1989.
- Camastra S, Manco M, Mari A, Baldi S, Gastaldelli A, Greco AV, Mingrone G, Ferrannini E: Beta-cell function in morbidly obese subjects during free living: long-term effects of weight loss. *Diabetes* 54: 2382-2389, 2005.
- Cao Y, Tao J-Q, Bates SR, Beers MF, Haczku A: IL-4 induces production of the lung collectin surfactant protein-D. *J Allergy Clin Immunol*, vol. 113 3: 439-444, 2004.
- Catalano C, Muscelli E, Quinones GA, Baldi S, Masoni A, Gibb I, Torfvit O, Seghieri G, Ferrannini E: Effect of insulin on systemic and renal handling of albumin in nondiabetic and NIDDM subjects. *Diabetes*, 46: 868-875, 1997.
- Cauchi S, Nead KT, Choquet H, Horber F, Potoczna N, Balkau B, Marre M, Charpentier G, Froguel P, Meyre D: The genetic susceptibility to type 2 diabetes may be modulated by obesity status: implications for association studies. *BMC Medical Genetics*, 45: 2350-2359, 2008.
- Cavallo-Perin P, Pacini G, Cerutti F, Bessone A, Condo C, Sacchetti L, Piga A, Pagano G: Insulin resistance and hyperinsulinemia in homozygous  $\beta$ -thalassemia. *Metabolism*, 44: 281-286, 1995.
- Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, Lloyd JK, Deanfield JE: Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet*, 340: 1111-1115, 1992.
- Chailly-Heu B, Rubio S, Rougier JP, Ducroc R, Bartlier Mur AM, Ronco P, Bourbon JR: Expression of hydrophilic proteins by mesentery cells in rat and man. *Biochem J*, 328: 251-256, 1997.
- Chalifour A, Jeannin P, Gauchat JF, Blaecke A, Malissard M, N'Guyen T, Thieblemont N, Delneste Y: Direct bacterial protein PAMP recognition by human NK cells involves TLRs and triggers  $\alpha$ -defensin production. *Blood*, 104: 1778-1783, 2004.
- Chaly YV, Paleolog EM, Kolesnikova TS, Tikhonov II, Petratchenko EV, Voitenok NN: Neutrophil alphadefensin human neutrophil peptide modulates cytokine production in human monocytes and adhesion molecule expression in endothelial cells. *Eur Cytokine Netw*, 11: 257-266, 2000.
- Chang TL, Francois F, Mosoian A, Klotman ME: CAF-mediated human immunodeficiency virus (HIV) type 1 transcriptional inhibition is distinct from  $\alpha$ -defensin-1 HIV inhibition. *J Virol*, 77: 6777-6784, 2003.

- Chang TL, Vargas JJr, DelPortillo A, Klotman ME: Dual role of  $\alpha$ -defensin-1 in anti-HIV-1 innate immunity. *J Clin Invest*, 115: 765-773, 2005.
- Charp PA, Rice WG, Raynor RL, Reimund E, Kinkade JM, Ganz T, Selsted ME, Lehrer RI, Kuo JF: Inhibition of protein kinase C by defensins, antibiotic peptides from human neutrophils. *Biochem Pharmacol*, 37: 951-956, 1988.
- Charriere G. et al.: Preadipocyte conversion to macrophage. Evidence of plasticity. *J Biol Chem*, 278: 9850-9855, 2003.
- Chen H, Xu Z, Peng L, Fang X, Yin X, Xu N, Cen P: Recent advances in the research and development of human defensins. *Peptides*, 27: 931-940, 2006.
- Chen MP, Chung FM, Chang DM, Tsai JC, Huang HF, Shin SJ, Lee YJ: Elevated plasma level of visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*, 91: 295-299, 2006.
- Cheng G, Ueda T, Nakajuma H, Nakajima A, Kinjyo S, Motojima S, Fukuda T: Suppressive effects of SP-A on ionomycin-induced IL-8 production and release by eosinophils. *Int Arch Allergy Immunol*, 117: 59-62, 1998.
- Childs RA, Wright JR, Ross GF, Yuen CT, Lawson AM, Chai W, Drickamer K, Feizi T: Specificity of lung surfactant protein SP-A for both the carbohydrate and the lipid moieties of certain neutral glycolipids. *J Biol Chem*, 267: 9972-9979, 1992.
- Christensen CK, Morgensen CE: The course of incipient diabetic nephropathy: studies of albumin excretion and blood pressure. *Diabetic Med*, 2: 97-102, 1985.
- Cho K, Matsuda T, Okajima S, Masumoto Y, Sagawa T, Fujimoto S, Kobashi K: Factors influencing pulmonary surfactant protein A levels in cord blood, maternal blood and amniotic fluid. *Biol Neonate*, 75: 104-110, 1999.
- Clark H, Palaniyar N, Strong P, Edmondson J, Hawgood S, Reid KBM: Surfactant protein D reduces alveolar macrophage apoptosis in vivo. *J Immunol*, 169: 2892-2899 2002.
- Clasen R, Schupp M et al.: PPAR-gamma-Activating Angiotensin Type-1 Receptors Blockers Induce Adiponectin. *Hypertension*, 46: 1-7, 2005.
- Clausen JO, Hansen T, Bjørbaek C, Echwald SM, Urhammer SA, Rasmussen S, Andersen CB, Hansen L, Almind K, Winther K, Haraldsdóttir J, Borch-Johnsen K, Pedersen O: Insulin resistance: interactions between obesity and a common variant of insulin receptor substrate-1. *Lancet*, 346: 397-402, 1995.
- Clement K, Garner C, Hager J, Philippi A, Due CL, Carey A, Harris T, Jury C: Indication for linkage of the human ob gene region with extreme obesity. *Diabetes*, 45: 687-690, 1996.
- Clement K, Philippi A, Jury C, Pivdal R, Hager J, Demenais F, Basdevant A, Guy-Grand B: Candidate gene approach of familial morbid obesity-linkage analysis of the glucocorticoid receptor gene. *Int J Obes*, 20: 507-512, 1996.
- Clement K, Vaisse C, Manning B, Basdevant A, Guy-Grand B, Ruiz J, Silver KD, Shuldiner AR, Froguel P, Strosberg AD: Genetic variation in the beta3-adrenergic receptor and an increased capacity to gain weight in patients with morbid obesity. *N Engl J Med*, 333: 352-354, 1995.

- Cohen B, Novick D, Rubinstein M: Modulation of insulin activities by leptin. *Science*, 274: 1183-1188, 1996.
- Combettes-Souverain M, Issad T: Molecular basis of insulin action. *Diabetes & Metabolism*, 24: 477-489, 1998.
- Condon JC, Jeyasuria P, Faust JM, Mendelson CR: Surfactant protein secreted by the maturing mouse fetal lung acts as a hormone that signals the initiation of parturition. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101: 4978-4983, 2004.
- Cook DG, Shaper AG, Thelle DA, Whetihead TP: Serum uric acid, serum glucose and diabetes: relationship in a population study. *Postgrad Med J*, 62: 1001-1006, 1986.
- Cook JT, Shields DC, Page RC. et al.: Segregation analysis of NIDDM in Caucasian Families. *Diabetologia*, 37: 1231-1240, 1994.
- Corcoran MP, Lamon-Fava S, Fielding RA: Skeletal muscle lipid deposition and insulin resistance: effect of dietary fatty acids and exercise. *Am J Clin Nutr*, 85(3): 662-677, 2007.
- Cousin B, Munoz O, Andre M, Fontanilles AM, Dani C, Cousin JL, Laharrague P, Casteilla L, Pénicaud L: A role for preadipocytes as macrophage-like cells. *FASEBJ*, 13: 305-312, 1999.
- Couto MA, Liu L, Lehrer RI, Ganz T: Inhibition of intracellular *Histoplasma capsulatum* replication by murine macrophages that produce human defensins. *Infect Immun*, 62: 2375-2378, 1994.
- Creuwls LAJM, van Golde LMG, Haagsman HP: The pulmonary surfactant system: biochemical and clinical aspects, *Lung*, 175: 1-39, 1997.
- Daher KA, Selsted ME, Lehrer RI: Direct inactivation of viruses by human granulocyte defensins. *J Virol*, 60: 1068-1074, 1986.
- Dahl M, Juvonen PO, Holmskov U, Husby S: Surfactant protein D in newborn infants: factors influencing surfactant protein D levels in umbilical cord blood and capillary blood. *Pediatr Res*, 58: 908-912, 2005.
- Dalziel B, Gosby AK, Richman RM, Bryson JM, Caterson ID: Association of the TNF-alpha -308 G/A promoter polymorphism with insulin resistance in obesity. *Obes Res*, 10: 401-407, 2002.
- Dandona P, Aljada A, Chaudhuri A, Bandyopadhyay A: The Potential Influence of Inflammation and Insulin Resistance on the Pathogenesis and Treatment of Atherosclerosis-Related Complications in Type 2 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*, 88(6): 2422-2429, 2003.
- Dandona P, Hussain MAM, Varghese Z, Politis D, Flynn DM, Hoffbrand AV: Insulin resistance and iron overload. *Ann Clin Biochem*, 20: 77-79, 1983.
- Davé V, Childs T, Whitsett JA: Nuclear Factor of Activated T Cells Regulates Transcription of the Surfactant Protein D Gene (*Sftpd*) via Direct Interaction with Thyroid Transcription Factor-1 in Lung Epithelial Cells. *J Biol Chem*, 279: 34578-34588, 2004.
- Davis WA, Knuiaman M, Kendall P, Grange V, Davis TM: Glycemic exposure is associated with reduced pulmonary function in type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 27: 752-757, 2004.

- De Smet K, Contreras R: Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins. *Biotechnol Lett*, 27: 1337-1347, 2005.
- Deeb SS, Fajas L, Nemoto M, Pihlajamaki J, Mykkanen L, Kuusisto J, Laakso M, Fujimoto W, Auwerx J: A Pro12Ala substitution in PPARgamma2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. *Nat Genet*, 20: 284-287, 1998.
- DeFronzo RA: Lilly lecture 1987. The triumvirate: beta-cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM. *Diabetes*, 37: 667-687, 1988.
- DeFronzo RA: Insulin resistance, hyperinsulinemia, and coronary artery disease: a complex metabolic web. *Coronary Art Dis*, 3: 11-25, 1992.
- DeFronzo RA, Bonadonna RC, Ferrannini E: Pathogenesis of NIDDM. *International Textbook of Diabetes Mellitus*, Second Edition, 635-711, 1997.
- DeFronzo RA, Ferrannini E: Insulin resistance: a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care*, 14: 173-194, 1991.
- DeFronzo RA, Mandarino L. & Ferrannini E: Metabolic and Molecular Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus. *International Textbook of Diabetes Mellitus*, Third Edition. Edited by R.A. DeFronzo, E. Ferrannini, H. Keen, and P. Zimmet, 389-438, 2004.
- Dekowski SA i Snyder JM: Insulin regulation of messenger ribonucleic acid for the surfactant-associated proteins in human fetal lung in vitro. *Endocrinology*, 131: 669-676, 1992.
- Diamong G, Kaiser V, Rhodes J, Russell JP, Bevins CL: Transcriptional regulation of  $\beta$ -defensin gene expression in tracheal epithelial cells. *Infect Immun*, 68: 113-119, 2000.
- Diamond G, Zasloff M, Eck H, Brasseur M, Maloy WL, Bevins CL: Tracheal antimicrobial peptide, a cysteine-rich peptide from mammalian tracheal mucosa: peptide isolation and cloning of a cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88: 3952-3956, 1991.
- DiAngelo S, Lin Z, Wang G, Phillips S, Ramet M, Luo J, Floros J: Novel, non-radioactive, simple and multiplex PcR-cRFLP methods for genotyping human SP-A and SP-D marker alleles. *Dis Markeres*, 15: 269-281, 1999.
- Dinneen S, Alzaid A, Turk D, Rizza R: Failure of glucagon suppression contributes to postprandial hyperglycemia in IDDM. *Diabetologia* 38: 337-343, 199.
- Dmocowski K, Finegood DT, Francombe W, Tyler B, Zinman B: Factors determining glucose tolerance in patients with thalassemia major. *J Clin Endocrinol Metab*, 77: 478-483, 1993.
- Dobbie JW: Surfactant protein A and lamellar bodies: a homologous secretory function of peritoneum, synovium and lung. *Perit Dial Int*, 16: 574-581, 1996.
- Dobbie JW, Tasiaux N, Meijers P, Anderson JD, Bodart C, Hind C, Bourguet C, Perret J: Lamellar bodies in synoviocytes, mesothelium and specific epithelia as possible site of auto-antigen in rheumatoid disease. *Br J Rheumatol*, 33: 508-519, 1994.

- Donnarumma G, Paoletti I, Buommino E, Orlando M, Tufano MA, Baroni A: *Malassezia furfur* induces the expression of  $\beta$ -defensin-2 in human keratinocytes in a protein kinase C-dependent manner. *Arch Dermatol Res*, 295: 474-481, 2004.
- Doyle IR, Nicholas TE, Bersten AD: Serum surfactant protein A levels in patients with acute cardiogenic pulmonary edema and adult respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*, 152: 307-317, 1995.
- Doyle IR, Nicholas TE, Bersten AD: Surfactant proteins A and B are elevated in plasma of patients with acute respiratory failure. *Am J Respir Crit Care Med*, 156: 1218-1229, 1998.
- Drucker DJ: The biology of incretin hormones. *Cell Metab*, 3: 153-165, 2006.
- Drucker DJ: Incretin-based therapies: a clinical need filled by unique metabolic effects. *Diabetes Educ*, 32 (2): 65S-71S, 2006.
- Duckworth WC, Bennet RG, Hamel FG: Insulin degradation: progress and potential. *Endocr Rev*, 19: 608-624, 1998.
- Duckworth WC, Fawcett J, Reddy S, Page JC: Insulin-degrading activity in wound fluid. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 847-851, 2004.
- Duggirala R, Stern M Mitchell L, Reinhart LJ, Shipman PA; Uresandi OC, Chung WK, Leibel RL, Hales CN, O'Connell P, Blangero J: Quantitative variation in obesity related traits and insulin precursors linked to ob gene region on human chromosome 7. *Am J Hum Genet*, 59: 694-703, 1996.
- Duits LA, Nibbering PH, van Strijen E, Vos JB, Mannesse-Lazeroms SP, van Sterkenburg MA, Hiemstra PS: Rhinovirus increases human  $\beta$ -defensin-2 and -3 mRNA expression in cultured bronchial epithelial cells. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 38: 59-64, 2003.
- Dulkerian SJ, Gonzales LW, Ning Y, Ballard PL: Regulation of surfactant protein D in human fetal lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 15: 781-786, 1996.
- Durr M i Peschel A: Chemokine meet defensin: the merging concepts of chemoattractants and antimicrobial peptides in host defense. *Infect Immun*, 4: 615-617, 2002.
- Durrington PN, Newton RS, Weinstein DB, Steinberg D: Effects of insulin and glucose on very low density lipoprotein triglyceride secretion by cultured rat hepatocytes. *J Clin Invest*, 70: 63-73, 1982.
- Eisenberg S: High-density lipoprotein metabolism. In Betteridge DJ, Illinworth DR, Shepherd J (eds), *Lipoproteins in Health and disease*. London: Arnold, 71, 1999.
- Eliakim R, Goetz GS, Rubio B, Chailley-Hue B, Shao JS, Ducroc R, Alpers DH: Isolation and characterization of surfactant-like particles in rat and human colon. *Am J Physiol*, 272: G425-434, 1997.
- Engström G i Janzon L: Risk of developing diabetes is inversely related to lung function: a population-based cohort study. *Diabetic Medicine*, 19: 167-170, 2002.
- Erpenbek VJ, Malherbe DC, Sommer S, Schmiedl A, Steinhilber W, Ghio AJ, Krug N, Wright JR, Hohlfeld JM: Surfactant protein D increases phagocytosis and aggregation of pollen-allergen starch granules. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 288: 692-698, 2004.

- Ethan D, Stolzenberg G, Anderson M: Epithelial antibiotic induced in states of disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 16: 8686-8690, 1997.
- Facchini FS, Hollenbeck CB, Jeppesen J, Chen YD, Reaven GM: Insulin resistance and cigarette smoking. *Lancet*, 339: 1128-1130, 1992.
- Farook VS, Hanson RL, Wolford JK, Bogardus C, Prochazka M: Molecular analysis of KCNJ10 on 1q as a candidate gene for Type 2 diabetes in Pima Indians. *Diabetes*, 51: 3342-3346, 2002.
- Fasshauer M i Paschke R: Regulation of adipocytokines and insulin resistance. *Diabetologia*, 46: 1594-1603, 2003.
- FengMing L, XiaoJing L, NaiHong Y, ShuanQing L, GuiQun C, QingYing C, QingJie X, HongJing W: Hypoxia-inducible transcription factor-1 $\alpha$  promotes hypoxia-induced A549 apoptosis via a mechanism that involves the glycolysis pathway. *BMC Cancer*, 6: 26, 2006.
- Ferguson JS, Voelker DR, McCormack FX, Schlesinger LS: Surfactant protein D binds to *Mycobacterium tuberculosis* bacilli and lipoarabinomannan via carbohydrate-lectin interactions resulting in reduced phagocytosis of the bacteria by macrophages. *J Immunol*, 163: 312-321, 1999.
- Ferguson JS, Voelker DR, Ufnar JA, Dawson AJ, Schlesinger LS: Surfactant protein D inhibition of human macrophage uptake of *Mycobacterium tuberculosis* is independent of bacterial agglutination. *J Immunol*, 168: 1309-1314, 2002.
- Fernández-Real JM, Broch M, Richart C, Vendrell J, López-Bermejo A, Ricart W: CD14 monocyte receptor, involved in the inflammatory cascade, and insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab*, 88: 1780-1784, 2003.
- Fernández-Real JM, Gutierrez C, Ricart W, Casamitjana R, Vendrell J, Fernández-Castañer M, Richart C, Soler J: The TNF- $\alpha$  Nco I polymorphism influences the relationship among insulin resistance, percent body fat and increased serum leptin levels. *Diabetes*, 46: 1468-1472, 1997.
- Fernández-Real JM, López –Bermejo A, Ropero AB, Piquer S, Nadal A, Bassols J, Casamitjana R, Gomis R, Arnaiz E, Pérez I, Ricart W: Salicylates increase insulin secretion in healthy obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab*, 7: 2523-2530, 2008.
- Fernández-Real JM, Molina A, Broch M, Ricart W, Gutiérrez C, Casamitjana R, Vendrell J, Soler J, Gómez-Sáez JM: Tumor necrosis factor system activity is associated with insulin resistance and dyslipidemia in myotonic dystrophy. *Diabetes*, 48:1108-1112, 1999.
- Fernández-Real JM, Penarroja G, Castro A, Garcia-Bragado F, Lopez-Bermejo A, Ricart W: Blood letting in high-ferritin type 2 diabetes: effects on vascular reactivity. *Diabetes Care*, 25: 2249-2255, 2002.
- Fernández-Real JM, Vayreda M, Richart C, Gutierrez C, Broch M, Vendrell J, Ricart W: Circulating interleukin 6 levels, blood pressure, and insulin sensitivity in apparently healthy men and women. *J Clin Endocrinol*, 86: 1154-1159, 2001.

- Fernández-Real JM i Ricart W: Insulin resistance and inflammation in an evolutionary perspective: the contribution on cytokine genotype/phenotype to thriftiness. *Diabetologia*, 42: 1367-1374, 1999.
- Fernández-Real JM i Ricart W: Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome. *Endocr Rev*, 24: 278-301, 2003.
- Ferrannini E, Barrett EJ, Bevilacqua S, DeFronzo RA: Effect of fatty acids on glucose production and utilization in man. *J Clin Invest*, 72: 1737-1747, 1983.
- Ferrannini E, Buzzigoli G, Bonadona R, Giorico MA, Oleggini M, Graziadei L, Pedrinelli R, Grandi L, Bevilacqua S: Insulin resistance in essential hypertension. *New Engl J Med*, 317: 350-357, 1987.
- Ferrer J, Wasson J, Salkoff L, Permutt MA: Cloning of human pancreatic islet large conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^{+}$  channel (hSlo) cDNAs: evidence for high levels of expression in pancreatic islets and identification of a flanking genetic marker. *Diabetologia*, 39: 891-898, 1996.
- Festa A, D'Agostino RJr, Howard G, Mykkanen L, Tracy RP, Haffner SM: Chronic subclinical inflammation as part of the insulin resistance syndrome: The insulin resistance atherosclerosis study (IRAS). *Circulation*, 102 (1): 42-47, 2000.
- Figueredo A, Ibarra JL, Bagazgoitia J, Rodríguez A, Molino AM, Fernández-Cruz A, Patino R: Plasma C3d levels and ischemic heart disease in type II diabetes. *Diabetes Care*, 16: 445-449, 1993.
- Froy O, Hananel A, Chapnik N, Madar Z: Differential effect of insulin treatment on decreased levels of beta-defensins and Toll-like receptors in diabetic rats. *Mol Immunol*, 44: 796-802, 2007.
- Fukuhara A, Matsuda M, Nishizawa M, Segawa K, Tanaka M, Kishimoto K, Matsuki Y, Murakami M, Ichisaka T, Murakami H, Watanabe E, Takagi T, Akiyoshi M, Ohtsubo T, Kihara S, Yamashita S, Makishima M, Funahashi T, Yamanaka S, Hiramatsu R, Matsuzawa Y, Shimomura I: Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science* 307: 426-430, 2005.
- Fulton C, Anderson GM, Zasloff M, Bull R, Quinn AG: Expression of natural peptide antibiotics in human skin. *Lancet*, 350: 1750-1751, 1997.
- Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I: Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest*, 114: 1752-1761, 2004.
- Ganda OM i Arkin CF: Hyperfibrinogenemia: an important risk factor for vascular complications in diabetes. *Diabetes Care*, 15: 1245-1250, 1992.
- Ganz T, Lehrer RI: Defensins. *Curr Opin Immunol*, 6: 584-589, 1994.
- Ganz T, Lehrer RI: Antimicrobial peptides of vertebrates. *Curr Opin Immunol*, 10: 41-44, 1998.
- Ganz T, Selsted ME, Szjkarej D, Harwing SS, Daher K, Bainton DF i col.: Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J Clin Invest*, 76: 1427-1435, 1985.

- Garcia JR, Jaumann F, Schulz S, Krause A, Rodriguez-Jimenez J, Forssmann U, Adermann K, Klüver E, Vogelmeier C, Becker D, Hedrich R, Forssmann W-G, Bals R: Identification of a novel, multifunctional  $\beta$ -defensin (hBD-3) with specific antimicrobial activity: its interaction with plasma membranes of *Xenopus* oocytes and the induction of macrophage chemoattraction. *Cell Tissue Res*, 306: 257-264, 2001a.
- Garcia JR, Krause A, Schulz S, Rodriguez-Jimenez F-J, Klüver E, Adermann K, Forssmann U, Frimpong-Boateng A, Bals R, Forssmann W-G: Human  $\beta$ -defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity. *FASEB J*, 15: 1819-1821, 2001b.
- Garcia-Verdugo I, Wang G, Floros J, Casals C: Structural analysis and lipid-binding properties of recombinant human surfactant protein A derived from one or both genes. *Biochemistry*, 41: 14041-14053, 2002.
- Gardai SJ, Xiao YQ, Dickinson M, Nick JA, Voelker DR, Greene KE, Henson PM: By binding SIRP $\alpha$  or calreticulin/CD91, lung collectins act as dual function surveillance molecules to suppress or enhance inflammation. *Cell*, 115: 13-23, 2003.
- Gaynor CD, McCormack FX, Voelker DR, McGowan SE, Schlesinger LS: Pulmonary surfactant protein A mediates enhanced phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* by a direct interaction to suppress or enhance inflammation. *Cell*, 115: 13-23, 1995.
- Geertsma MF, Nibbering PH, Haagsman HP, Daha MR, van Furth R: Binding of surfactant protein A to C1q receptors mediates phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by monocytes. *Am J Physiol*, 267: L578-L584, 1994.
- George TN, Miakotina OL, Goss KL, Snyder JM: Mechanism of all trans-retinoic acid and glucocorticoid regulation of surfactant protein mRNA. *Am J Physiol*, 274: L560-L566, 1998.
- George TN i Snyder JM: Regulation of surfactant protein gene expression by retinoic acid metabolites. *Pediatr Res*, 41: 692-701, 1997.
- Ghildyal R, Hartley C, Varrasso A, Meanger J, Voelker DR, Anders EM, Mills J: Surfactant protein A binds to the fusion glycoprotein of respiratory syncytial virus and neutralizes virion infectivity. *J Infect Dis*, 180: 2009-2013, 1999.
- Ghosh D, Porter E, Shen B, Lee SK, Wilk D, Drazba J, Yadav SP, Crabb JW, Ganz T, Bevins CL: Paneth cell trypsin is the processing enzyme of human defensin-5. *Nat Immunol*, 3: 583-590, 2002.
- Giamila Fantuzzi, PhD: Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *Mol Mech All Clin Immunol*, 911-919, 2005.
- Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP: In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst*, 51(5): 1417-1723, 1973.
- Ginsberg HN: Insulin resistance and cardiovascular disease. *J Clin Invest*, 106: 453-458, 2000.
- Gloyn AL, Hashim Y, Ashcroft SJ, Ashfield R, Wiltshire S, Turner RC: UK Prospective Diabetes Study (UKPDS53). Association studies of variants in promoter and coding regions

of beta-cell ATP-sensitive K-channel genes SUR1 and Kir6.2 with type 2 diabetes mellitus (UKPDS53). *Diabet Med*, 18: 206-212, 2001.

- Gloy AL, Weedon MN, Owen KR, Turner RC, Knight BA, Hitman G, Walker M. et al.: Large-scale association studies of variants in genes encoding the pancreatic beta-cell KATP channel subunits Kir6.2 (KCNJ11) and SUR1 (ABCC8) confirm that the KCNJ11 E23K variant is associated with type 2 diabetes. *Diabetes*, 52: 568-572, 2003.
- Gomis R, Gasa R, Usac EF: Diabetis Mellitus (bases bioquímiques i fisiopatològiques de la Diabetis Mellitus). *El Mèdul, editors*. Barcelona: Associació Catalana de Diabetis, 3: 45-56, 1996.
- Goss KL, Kumar AR, Snyder JM: SP-A2 gene expression in human fetal lung airways. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 19: 613-621, 1998.
- Grapin-Botton A, Majithia AR, Melton DA: Key events of pancreas formation are triggered in gut endoderm by ectopic expression of pancreatic regulatory genes. *Genes Dev*, 15(4): 444-454, 2001.
- Greet Van der Berghe: How does blood glucose control with insulin save lives in intensive care? *J Clin Invest*, 114: 1187-1195, 2004.
- Griese M, Essl R, Schmidt R, Rietschel E, Ratjen F, Ballmann M, Paul K, BEAT Study Group: Pulmonary surfactant, lung function, and endobronchial inflammation in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 170: 1000-1005, 2004.
- Groeneveld TWL, Oroszlán M, Owens RT, Faber-Krol MC, Bakker AC, Arlaud GJ, McQuillan DJ, Kishore U, Daha MR, Roos A: Interaction of the extracellular matrix proteoglycans, decorin and biglycan, with C1q and collections. *J Immunol*, 2005.
- Grundy SM, MD, PhD: Inflammation, Metabolic Syndrome, and Diet Responsiveness. *Circulation*, 126-128, 2003.
- Gubern C, López-Bermejo A, Biarnés J, Vendrell J, Ricart W, Fernández-Real JM. Natural antibiotics and insulin sensitivity: The role of bactericidal and permeability increasing protein (BPI). *Diabetes*, 55: 216-224, 2006.
- Guillot L, Balloy V, McCormack FX, Golenbock DT, Chignard M i col.: Cutting edge: the immunostimulatory activity of the lung surfactant protein-A involves Toll-like receptor 4. *J Immunol*, 168: 5989-5992, 2002.
- Guldstrand M, Ahren B, Adamson U: Improved beta-cell function after standardized weight reduction in severely obese subjects. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 284: 557-565, 2003.
- Gupta G i Suroli A: Collections: sentinels of innate immunity. *Bioessays*, 29(5): 452-464, 2007.
- Haagsman HP i van Golde LM: Synthesis and assembly of lung surfactant. *Annu Rev Physiol*, 53: 441-464, 1991.
- Haffner SM, Stern MP, Gruber MK, Hazuda HP, Mitchell BD, Patterson JK: Microalbuminuria. Potential marker for increased cardiovascular risk factors in non-diabetic subjects? *Arteriosclerosis*, 10: 727-731, 1990.
- Hager SR: Insulin resistance of uremia. *Am J Kidney Dis*, 14: 272-276, 1989.

- Haider DG, Schaller G, Kapiotis S, Maier C, Luger A, Wolzt M: The release of the adipocytokine visfatin is regulated by glucose and insulin. *Diabetologia*, 2006a.
- Haider DG, Schindler K, Schaller G, Prager G, Wolzt M, Ludvik B: Increased plasma visfatin concentrations in morbidly obese subjects are reduced after gastric banding. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006b.
- Hailman E, Lichenstein HS, Wurfel MM, Miller DS, Johnson DA, Kelley M, Busse LA, Zukowski MM, Wright SD: Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14. *J Exp Med*, 179: 269, 1994.
- Hakansson K, Lim NK, Hoppe HJ, Reid KBM: Crystal structure of the trimeric  $\alpha$ -helical coiled-coil and the three lectin domains of human lung surfactant protein D. *Struc Fold Des*, 7: 255-264, 1999.
- Hale PJ, Wright JV, Natrass M: Differences in insulin sensitivity between normal men and women. *Metabolism*, 34: 1133-1138, 1985.
- Hales CN, Barker DJ, Clark PM, Cox LJ, Fall C, Osmond C, Winter PD: Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. *BMJ*, 303: 1019-1022, 1991.
- Hammarstedt A, Pihlajamaki J, Sopasakis VR, Gogg S, Jansson PA, Laakso M, Smith U: Visfatin is an adipokine but it is not regulated by thiazolidinediones. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006.
- Hani EH, Boutin P, Durand E, Inoue H, Permutt MA, Velho G, Froguel P: Missense mutations in the pancreatic islet beta cell inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel gene (KIR6.2/BIR): a meta-analysis suggests a role in the polygenic basis of Type II diabetes mellitus in Caucasians. *Diabetologia*, 48: 1511-1515, 1998.
- Hanis CL, Boerwinkle E, Chakraborty R, Ellsworth DL, Concannon P, Stirling B, Morrison VA, Wapelhorst B, Spielman RS, Gogolin-Ewens KJ, Shepard JM, Williams SR, Risch N, Hinds D, Iwasaki N, Ogata M, Omori Y, Petzold C, Rietzch H, Schröder HE, Schulze J, Cox NJ, Menzel S, Boriraj VV, Chen X, Lim LR, Lindner T, Mereu LE, Wang YQ, Xiang K, Yamagata K, Yang Y, Bell GI: A genome-wide search for human non-insulin-dependent (type 2) diabetes genes reveals a major susceptibility locus on chromosome 2. *Nat Genet*, 13: 161-166, 1996.
- Hara K, Okada T, Tobe K, Yasuda K, Mori Y, Kadowaki H, Hagura R. i col.: The Pro12Ala polymorphism in PPAR gamma2 may confer resistance to type 2 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun*, 271: 212-216, 2000.
- Harder J, Bartels J, Christophers E: Isolation and characterization of human beta defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem*, 276: 5707-5713, 2001.
- Harder J, Bartels J, Christophers E, Schröder J-M: A peptide antibiotic from human skin. *Nature*, 387: 861, 1997.
- Harder J, Meyer-hoffert U, Teran LM: Mucoid *Pseudomonas aeruginosa*, TNF $\alpha$ , and IL1b, but not IL-6 induce HBD-2 in respiratory epithelia. *Cell Mol Biol Res*, 22: 714-721, 2000.

- Harder J, Siebert R, Zhang Y, Matthiesen P, Christophers E, Schlegelberger B, Schroder JM: Mapping of the gene encoding human beta-defensin-2 (*DEFB2*) to chromosome region 8p22-p23:1. *Genomics*, 46: 472-475, 1997.
- Hartshorn KL, Crouch EC, White MR, Eggleton P, Tauber AI, Chang D, Sastry KN: Evidence for a protective role of pulmonary surfactant protein D (SP-D) against influenza A viruses. *J Clin Invest*, 94: 311-319, 1994.
- Hartshorn KL, Reid KBM, White MR, Jensenius JC, Morris SM, Tauber AI, Crouch EC: Neutrophil deactivation by influenza A viruses: mechanisms of protection after viral opsonization with collectins and hemagglutination-inhibiting antibodies. *Blood*, 87: 3450-3461, 1996.
- Harvald B, Hauge M: Selection in diabetes in modern society. *Acta Med Scand*, 173: 459-465, 1983.
- Hasday JD, Bascom R, Costa JJ, Fitzgerald T, Dubin W: Bacterial endotoxin is an active component of cigarette smoke. *Chest*, 115: 829-835, 1999.
- Haurum JS, Thiel S, Haagsman HP, Laursen SB, Larsen B, Jensenius JC: Studies on his carbohydrate-binding characteristics of human pulmonary surfactant-associated protein A and comparison with two other collectins: mannan-binding protein and conglutinin. *Biochem J*, 293: 876-878, 1993.
- Havel PJ: Update on adipocyte hormones: regulation of energy balance and carbohydrate/lipid metabolism. *Diabetes*, 53 Suppl 1: S143-S151, 2004.
- Hawgood S, Brown C, Edmondson J, Stumbaugh A, Allen L, Goerke J, Clark H, Poulain F: Pulmonary collectins modulate strain specific influenza a virus infection and host responses. *J Virol*, 78: 8565-8572, 2004.
- Haziot A, Tsuberi BZ, Goyert SM: Neutrophil CD14: biochemical properties and role in the secretion of tumor necrosis factor-alpha in response to lipopolysaccharide. *J Immunol*, 150: 5556, 1993.
- Hazra S, Batra RK, Tai HH, Sharma S, Cui X, Dubinett SM: Pioglitazone and rosiglitazone decrease prostaglandin E<sub>2</sub> in non-small-cell lung cancer cells by up-regulating 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase. *Mol Pharmacol*, 71: 1715-1720, 2007.
- He Y, Crouch EC, Rust K, Spaite E, Brody S. L: Proximal Promoter of the Surfactant Protein D Gene. *J Biol Chem*, 40: 31051-31060, 2000.
- He Y i Crouch E: Surfactant Protein D Gene Regulation. *J Biol Chem*, 22: 19530-19537, 2002.
- Head JF, Mealy TR, McCormack FX, Seaton BA: Crystal structure of trimeric carbohydrate recognition and neck domains of surfactant protein A. *J Biol Chem*, 44: 43254-43260, 2003.
- Hedin CH: Protein tyrosine kinase receptors. Imperial Cancer Research Foundation editors. *Cancer Surveys*, 7-24, 1996.
- Heesom KJ, Herbeck M, Khan CR, Denton RM: Insulin action on metabolism. *Diabetologia*, 40: 3-9, 1997.

- Heidinger K, König IR, Bohnert A, Kleinsteiber A, Hilgendorff A, Gortner L, Ziegler A, Chakraborty T, Bein G: Polymorphisms in the human surfactant protein-D (*SFTPD*) gene: strong evidence that serum levels of surfactant protein-D (SP-D) are genetically influenced. *Immunogenetics*, 57: 1-7, 2005.
- Heimberg H, De Vos A, Moens K, Quartier E, Bouwens L, Pipeleers D, Van Schaftingen E, Madsen O, Schnuit F: The glucose sensor protein glucokinase is expressed in glucagon-producing  $\alpha$ -cells. *Cell Biol*, 93: 7036-7041, 1996.
- Hendrick GT, Wasserman DH, Tyler Frizzel R, Williams PE, Lacy DB, Jaspan JB, Cherrington AD: Importance of basal glucagon in maintaining hepatic glucose production during a prolonged fast in conscious dogs. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 263: E541-549, 1992.
- Heo M, Leibel RL, Fontaine KR, Boyer BB, Chung WK, Koulu M, Karvonen MK, Peonen U, Rissanen A, Laakso M, Uusitupa MI, Chagnon Y, Bouchard C, Donohoue PA, Burns TL, Shuldiner AR, Silver K, Andersen RE, Pedersen O, Echwald S, Sorensen TI, Behn P, Permutt MA, Jacobs KB, Elston RC, Hoffman DJ, Gropp E, Allison DB: A meta-analytic investigation of linkage and association of common leptin receptor (LEPR) polymorphisms with body mass index and waist circumference. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 26: 640-646, 2002.
- Hermans C i Bernard A: Lung epithelium-specific proteins: characteristics and potential applications as markers. *Am J Respir Crit Care Med*, 159: 646-678, 1999.
- Herrmann SM, Ricard S, Nicaud V, Mallet C, Arveiler D, Evans A, Ruidavets JB, Luc G, Bara L, Parra HJ, Poirier O, Cambien F: Polymorphisms of the tumour necrosis factor- $\alpha$  gene, coronary heart disease and obesity. *Eur J Clin Invest*, 28: 59-66, 1998.
- Higazi AA, Ganz T, Kariko K, Cines DB: Defensin modulates tissue-type plasminogen activator and plasminogen binding to fibrin and endothelial cells. *J Biol Chem*, 271: 17650-17655, 1996.
- Higazi AA, Lavi E, Bdeir K, Ulrich AM, Jamieson DG, Rader DJ, Usher DC, Kane W, Ganz T, Cines DB: Defensin stimulates the binding of lipoprotein (a) to human vascular endothelial and smooth muscle cells. *Blood*, 89: 4290-4298, 1997.
- Higazi AA, Nassar T, Ganz T, Rader DJ, Udassin R, Bdeir K, Hiss E, Sachais BS, Williams KJ, Leitersdorf E, Cines DB: The alpha-defensins stimulate proteoglycan-dependent catabolism of low-density lipoprotein by vascular cells: a new class of inflammatory apolipoprotein and a possible contributor to atherogenesis. *Blood*, 96: 1393-1398, 2000.
- Higuchi T, Watanabe Y, Waga I: Protein disulfide isomerase suppresses the transcriptional activity of NF-kappaB. *Biochem Biophys Res Commun*, 318: 46-52, 2004.
- Hiratsuka T, Nakasato M, Date Y, Ashitani J, Minematsu T, Chico N, Matsukar S: Identification of  $\beta$ -defensins-2 in respiratory tract and plasma and its increase in bacterial pneumonia. *Commun Biochem Biophys Res Commun*, 249: 943-947, 1998.

- Hiratsuka T, Nakasato M, Date Y, Mukae H, Matsukura S: Nucleotide sequence and expression of rat beta-defensin-1: its significance in diabetic rodent models. *Nephron*, 88: 65-70, 2001.
- Hirche TO, Crouch EC, Espinola M, Brokelman TJ, Mecham RP, DeSilva N, Cooley J, Remold-O'Donnell E, Belaouaj A: Neutrophil serine proteinases inactivate surfactant protein D by cleaving within a conserved subregion of the carbohydrate recognition domain. *J Biol Chem*, 279: 27688-27698, 2004.
- Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Görgün CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M, Hotamisligil GS: A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature*, 420: 333-336, 2002.
- Hjalmarsen A, Aasebo U, Birkeland K, Sager G, Jorde R: Impaired glucose tolerance in patients with chronic hypoxic pulmonary disease. *Diabetes Metab*, 22: 37-42, 1996.
- Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RAB: Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science*, 284: 1313-1318, 1999.
- Hoffstedt J, Eriksson P, Hellstrom L, Rossner S, Rydén M, Arner P: Excessive fat accumulation is associated with the TNF alpha-308 G/A promoter polymorphism in women but not in men. *Diabetologia*, 43: 117-120, 2000.
- Holcomb IN, Kabakoff RC, Chan B i col.: FIZZ1, a novel cysteine-rich secreted protein associated with pulmonary inflammation, defines a new gene family. *EMBO J*, 19: 4046-4055, 2000.
- Holmskov U, Thiel S, Jensenius JC: Collections and ficolins: humoral lectins of the innate immune defense. *Annu Rev Immunol*, 21: 547-578, 2003.
- Hoover RR, Thomas KH, Floros J: Glucocorticoid inhibition of human SP-A1 promoter activity in NCI-H441 cells. *Biochem H*, 340(1): 69-76, 1999.
- Hotamisligil GS: The role of TNFalpha and TNF receptors in obesity and insulin resistance. *J Intern Med*, 245(6): 621-625, 1999.
- Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM: Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest*, 95: 2409-2415, 1995.
- Hotamisligil GS, Peraldi P, Budovari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM: IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha-and obesity-induced insulin resistance. *Science*, 271: 665-668, 1996.
- Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM: Adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*, 259: 87-91, 1993.
- 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, Matsuzawa Y: Plasma concentration of a novel adipose specific protein adiponectin in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20: 1595-1599, 2000.
- Howard BV: Lipoproteins: structure and function. In *Draznin B, Eckel RH (eds) Diabetes and atherosclerosis. Molecular basis and clinical aspects. New York: Elsevier*, 3-15, 1993.

- Howard G, O'Leavy DH, Zaccaro D, Haffner S, Rewers M, Haman R, Selby JV, Saad MF, Savage P, Bergman R: Insulin sensitivity and atherosclerosis. *Circulation*, 93: 1809-1817, 1996.
- Huang W, Wang G, Phelps DS, Al-Mondhiry H, Floros J: Human SP-A genetic variants and bleomycin-induced cytokine production by THP-1 cells: effect of ozone-induced SP-A oxidation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 286: L546-L553, 2004.
- Hug CH i Lodisch HF: Visfatin: A new adipokine. *Science*, 307: 366-367, 2005.
- Hukshorn CJ, van Dielen FM, Buurman WA, Westertero-Plantenga MS, Campfield LA, Saris WH: The effect of pegylated recombinant human leptin (PEG-OB) on weight loss and inflammatory status in obese subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 26: 504-509.
- Hundal RS, Petersen KF, Mayerson AB, Randhawa PS, Inzucchi S, Shoelson SE, Shulman GI: Mechanism by which high-dose aspirin improves glucose metabolism in type 2 diabetes. *J Clin Invest*, 109: 1321-1326, 2002.
- Husby S, Herskind AM, Jensenius JC, Holmskov U: Heritability estimates for the constitutional levels of the collectins mannan-binding lectin and lung surfactant protein D. A study of unselected like-sexed mono- and dizygotic twins at the age of 6-9 years. *Immunology*, 106: 389-394, 2002.
- Huttner KM, Bevins CL: Antimicrobial peptides as mediators of epithelial host defense. *Pediatr Res*, 45: 785-794, 1999.
- Huypens P, Ling Z, Pipeleers D, Schuit F: Glucagon receptors on human islet cells contribute to glucose competence of insulin release. *Diabetologia*, 43(8): 1012-1019, 2000.
- Hyakushima N, Mitsuzawa H, Nishitani C, Sano H, Kuronuma K, Konishi M, Himi T, Miyake K, Kuroki Y: Interaction of soluble form of recombinant extracellular TLR4 domain with MD-2 enables lipopolysaccharide binding and attenuates TLR-4 mediated signaling. *J Immunol*, 173: 6949-6954, 2004.
- Ihi T, Nakazato M, Mukae H, Matsukura S: Elevated concentrations of human neutrophil peptides in plasma, blood, and body fluids from patients with infections. *Clin Infect Dis*, 25: 1134-1140, 1997.
- Imbeault P, Prins JB, Stolic M, Russell AW, O'Moore-Sullivan T, Despres JP, Bouchard C, Tremblay A: Aging per se does not influence glucose homeostasis: in vivo and in vitro evidence. *Diabetes Care* 26: 480-484, 2003.
- Inselmans LS, Chander A, Spitzer AR: Diminished lung compliance and elevated surfactant lipids and proteins in nutritionally obese young rats. *Lung*, 182: 101-117, 2004.
- Ishii T, Hirose H, Saito I, Nishikai K, Maruyama H, Saruta T: Tumor necrosis factor alpha gene G-308A polymorphism, insulin resistance, and fasting plasma glucose in young, older, and diabetic Japanese men. *Metabolism*, 49: 1616-1618, 2000.
- Islam KN i Mendelson CR: Permissive effects of oxygen on cyclic AMP and interleukin-1 stimulation of surfactant protein A gene expression are mediated by epigenetic mechanisms. *Mol Cell Biol*, 26: 2901-2912, 2006.

- Itoh Y, Kawamata Y, Harada M, Kobayashi M, Fujii R, Fukusumi S, Ogi K, Hosoya M, Tanaka Y, Uejima H, Tanaka H, Maruyama M, Satoh R, Okubo S, Kizawa H, Komatsu H, Matsumura F, Noguchi Y, Shinohara T, Hinuma S, Fujisawa Y, Fujino M: Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40. *Nature*, 422: 173-176, 2003.
- Jan MS, Huang YH, Shieh B, Teng RH, Yan YP, Lee YT, Liao KK, Li C: CC chemokines induce neutrophils to chemotaxis, degranulation, and  $\alpha$ -defensin release. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 41: 6-16, 2006.
- Jia HP, Schutte BC, Schudy A, Linzmeier R, Guthmiller JM, Johnson GK, Tack BF, Mitros JP, Rosenthal A, Ganz T, McCray PB Jr: Discovery of new human beta-defensins using a genomics-based approach. *Gene*, 263: 211-218, 2001.
- Jia SH, Li Y, Parodo J, Kapus A, Fan L, Rotstein OD and Marshall JC: Pre-B cell colony-enhancing factor inhibits neutrophil apoptosis in experimental inflammation and clinical sepsis. *J Clin Invest*, 2004.
- Johnson S, Michalak M, Opas M, Eggleton P: The ins and outs of calreticulin: from the ER lumen to the extracellular space. *Trends Cell Biol*, 11: 122-129, 2001.
- Jones DE i Bevins CL: Paneth cells of human small intestine express an antimicrobial peptide gene. *J Biol Chem*, 267: 23216-23225, 1992.
- Juhan-Vague I, Alessi MC, Vague P: Thrombogenic and fibrinolytic factors and cardiovascular risk in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Ann Med*, 28: 371-380, 1996.
- Kabha K, Schmegner J, Keisari Y, Parolis H, Schlepper-Schaeffer J, Ofek I: SP-A enhances phagocytosis of *Klebsiella* by interaction with capsular polysaccharides and alveolar macrophages. *Am J Physiol*, 272: L344-L352, 1997.
- Kagan BL, Ganz T, Lehrer RI: Defensins: a family of antimicrobial and cytotoxic peptides. *Toxicology*, 87: 131-149, 1994.
- Kahn CR: Insulin action, diabetogenes, and the cause of type II diabetes. *Diabetes*, 43: 1066-1082, 1994.
- Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM: Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*, 444: 840-846, 2006.
- Kahn SE, Prigeon RL, McCulloch DK, Boyko EJ, Bergman RN, Schwartz MW, Neifing JL, Ward WK, Beard JC, Palmer JP, i col.: Quantification of the relationship between insulin sensitivity and beta-cell function in human subjects. Evidence for a hyperbolic function. *Diabetes*, 42: 1663-1672, 1993.
- Kaiser V and Diamond G: Expression of mammalian defensin genes. *J Leukoc Biol*, 68: 779-784, 2000.
- Kang W, Nielsen O, Fenger C, Madsen J, Hansen S, Tornoe I, Eggleton P, Reid KBM, Holmskov U: The scavenger receptor, cysteine-rich domain-containing molecule gp-340 is differentially regulated in epithelial cell lines by phorbol ester. *Clin Exp Immunol*, 130: 449-458, 2002.

- Kannel WB, D'Argentino RB, Wilson PWF, Belanger AJ, Gagnon DR: Diabetes, fibrinogen, and risk of cardiovascular disease: the Framingham experience. *Am Heart J*, 120: 672-676, 1990.
- Kaplan SA, Barrett CT, Scott ML, Whitson RH: Insulin receptors in fetal rabbit lung type II cells. *Endocrinology*, 114: 2199-2204, 1984.
- Kappes A, Loffler G: Influences of iono-mycin, dibutyryl-cycloAMP and tumor necrosis factor alpha on intracellular amount and secretion of apM1 in differentiating primary human preadipocytes. *Hormone Metab Res*, 32: 548-554, 2000.
- Kasper M, Sims G, Koslowski R, Kuss H, Thuemmler M, Fehrenbach H, Auten RL: Increased surfactant protein D in rat airway goblet and Clara cells during ovalbumin-induced allergic airway inflammation. *Clin Exp Allergy*, 32: 1251-1258, 2002.
- Kasuga M: Insulin resistance and pancreatic  $\beta$  cell failure. *J Clin Invest*, 7: 1756-1760, 2006.
- Katyal SL, Estes LW, Lombardi B: Method for the isolation of surfactant from homogenates and lavages of lung of adult, newborn, and fetal rats. *Lab Invest*, 36: 585-592, 1977.
- Katyal SL, Singh G, Locker J: Characterization of a second human pulmonary surfactant-associated protein SP-A gene. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 6: 446-450, 1992.
- Ka-Wai Hui E, Smee DF, Wong MH, Nayak DP: Mutations in Influenza Virus M1 CCHH, the putative zinc finger motif, cause attenuation in mice and protect mice against lethal influenza virus infection. *J Virol*, Vol.80, 12: 5697-5707, 2006.
- Kawamori D, Kajimoto Y, Kaneto H, Umayahara Y, Fufitani Y, Miyatsuka T, Watada H, Leibiger IB, Yamasaki Y, Hori M: Oxidative stress induces nucleo-cytoplasmic translocation of pancreatic transcription factor Pdx-1 through activation of c-Jun NH2-terminal kinase. *Diabetes*, 52: 2596-2904, 2003.
- Kendal CE i Bryant-Greenwood: Pre-B Colony-enhancing Factor (PBEF/Visfatin) Gene Expression is Modulated by NF-kB and AP-1 in Human Amniotic Epithelial Cells. *Placenta*, 20: 1-10, 2006.
- Kershaw EE, Flier JS: Adipose Tissue as an Endocrine Organ. *J Clin Endocrinol Metab*, 89: 2548-2556, 2004.
- Khor A, Gray ME, Hull WM, Whitsett JA, Stahlman MT: Developmental expression of SP-A and SP-A mRNA in the proximal and distal respiratory epithelium in the human fetus and newborn. *J Histochem Cytochem*, 41: 1311-1319, 1993.
- Khovidhunkit W, Kim MS, Memon RA, Shigenaga JK, Moser AH, Feingold KR, Grunfeld C: Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: mechanisms and consequences to the host [review]. *J Lipid Res*, 45: 1169-1196, 2004.
- Khubchandani KR, Oberley RE, Snyder JM: Effects of surfactant protein A and NaCl concentration on the uptake of *Pseudomonas aeruginosa* by THP-1 cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 25: 699-706, 2001.

- Kierstein S, Poulain FR, Cao Y, Grous M, Mathias R, Kierstein G, Beers MF, Salmon M, Panettieri Jr RA, Haczku A: Susceptibility to ozone-induced airway inflammation is associated with decreased levels of surfactant protein D. *Respiratory Research*, 7: 85-94, 2006.
- Kim KE, Lee K, Moon YS, Sul HS: A cysteine-rich adipose tissue-specific secretory factor inhibits adipocyte differentiation. *J Biol Chem*, 276: 11252-11256, 2001.
- Kim JK: Fat uses a TOLL-road to connect inflammation and diabetes. *Cell Metab*, 4(6): 417-419, 2006.
- Kingma PS i Whitsett JA: In defense of the lung: surfactant protein A and surfactant protein D. *Current Opinion in Pharmacology*, 6: 277-283, 2006.
- Kishore U, Bernal AL, Kamran MF, Saxena S, Singh M, Sarma PU, Madan T, Chakraborty T: Surfactant protein SP-A and SP-D in human health and disease. *Arch Immunol Ther Exp*, 53: 399-417, 2005.
- Kishore U, Gaboriaud C, Waters P, Shrive AK, Greenhough TJ, Reid KBM, Sim RB, Arlaud GJ: C1q and tumor necrosis factor superfamily: modularity and versatility. *Trends Immunol*, 225: 551-561, 2004.
- Kishore U, Greenhough T.J, Waters P, Shrive A.K, Ghai R, Kamran M.F, López Bernal A, Reid K.B.M, Madan T, Chakraborty T: Surfactant proteins SP-A and SP-D: Structure, function and receptors. *Mol Immunol*, 1-23, 2006.
- Kishore U, Madan T, Sarma PU, Singh M, Urban BC, Reid KBM: Protective roles of pulmonary surfactant proteins, SP-A and SP-D, against lung allergy and infection caused by *Aspergillus fumigatus*. *Immunobiology*, 205: 610-618, 2002.
- Kishore U i Reid KBM: Structures and functions of mammalian collectins. In: Crocker P (Ed), Mammalian Carbohydrate Recognition Proteins Results and Problems in Cell Differentiation Series. *Springer*, 225-248, 2001.
- Kishore U, Wang JY, Hoppe HJ, Reid KBM: The  $\alpha$ -helical neck region of human lung surfactant protein D is essential for the binding of the carbohydrate recognition domains to lipopolysaccharides and phospholipids. *Biochem J*, 505-511, 1996.
- Kisich K, Heifets L, Higgins M, Diamond G: Antimicrobial agent based on mRNA encoding human b-defensin-2 enables primary macrophages to restrict growth of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*, 69: 2692-2699, 2002.
- Kisich K, Michael H, Diamond G, Heifets L: Tumor necrosis factor alpha stimulates killing of *Mycobacterium tuberculosis* by human neutrophils. *Infect Immun*, 70: 4591-4599, 2002.
- Klotman ME i Chang TL: Defensins in innate antiviral immunity. *Nature*, 6: 447-456, 2006.
- Knobler H, Zhornicky T, Sandler A, Haran N, Ashur Y, Schattner A: Tumor necrosis factor-alpha-induced insulin resistance may mediate the hepatitis C virus-diabetes association. *Am J Gastroenterol*, 98: 2751-2756, 2003.
- Knutson VP: Cellular trafficking and processing of the insulin receptor. *FASEB J*, 5: 2130-2138, 1991.

- Kolterman OG, Insel J, Saekow M, Olefsky JM: Mechanisms of insulin resistance in human obesity: evidence for receptor and postreceptor defects. *J Clin Invest*, 65: 1272-1284, 1980.
- Kondo H, Shimomura I, Matsukawa Y, Kumada M, Takahashi M, Matsuda M, Ouchi N, Kihara S, Kawamoto T, Sumitsuji S, Funahashi T, Matsuzawa Y: Association of adiponectin mutation with type 2 diabetes: a candidate gene for the insulin resistance syndrome. *Diabetes*, 51: 2325-2328, 2002.
- Körner A, Böttcher Y, Enigk B, Kiess W, Stumvoll M, Kovacs P: Effects of genetic variation in the visfatin gene (*PBEF1*) on obesity, glucose metabolism, and blood pressure in children. *Metab Clin Exp*, 56: 772-777, 2007.
- Kougas P, Chai H, Lin PH, Yao Q, Lumsden AB, Chen C: Neutrophil antimicrobial peptide alpha-defensin causes endothelial dysfunction in porcine coronary arteries. *J Vasc Surg*, 43: 357-363, 2006.
- Koziel H i Koziel MJ: Pulmonary complications of diabetes mellitus. Pneumonia. *Infect Dis Clin North Am*, 9: 65-96, 1995.
- Kralisch S, Klein J, Lossner U, Bluher M, Paschke R, Stumvoll M, Fasshauer M: Hormonal regulation of the novel adipocytokine visfatin in 3T3-L1 adipocytes. *J Endocrinol*, 185: 1-8, 2005. (a)
- Kralisch S, Klein J, Lossner U, Bluher M, Paschke R, Stumvoll M, Fasshauer M: Interleukin-6 is a negative regulator of visfatin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 289: 586-590, 2005. (b)
- Krisanaprakornkit S, Weinberg A, Perez CN, Dale BA: Expression of the peptide antibiotic human  $\beta$ -defensin 1 in cultured gingival epithelial cells and gingival tissue. *Infect Immun*, 66: 4222-4228, 1998.
- Krizkova L, Sakthivel R, Olowe SA, Rogan PK, Floros J: Human SP-A: genotype and single-strand conformation polymorphism analysis. *Am J Physiol*, 266: L519-L527, 1994.
- Krotkiewski M, Björntorp P, Sjöström L, Smith U: Impact of obesity on metabolism in men and women: importance of regional adipose tissue distribution. *J Clin Invest*, 72: 1150-1162, 1983.
- Kuroki Y i Akino T: Pulmonary surfactant protein A (SP-A) specifically binds dipalmitoylphosphatidylcholine. *J Biol Chem*, 266: 3068-3073, 1991.
- Kuroki Y, Takahashi H, Chiba H, Akino T: Surfactant proteins A and D: disease markers. *Biochim Biophys Acta*, 1408: 334-345, 1998.
- Kuroki Y, Tsutahara S, Shijubo N, Takahashi H, Shiratori M, Hattori A, Honda Y, Abe S, Akino T: Elevated levels of lung surfactant protein A in sera from patients with idiopathic pulmonary fibrosis and pulmonary alveolar proteinosis. *Am Rev Respir Dis*, 147: 723-729, 1993.
- Kur-Ta C, Yu-Chen H, Yin-Shiou L, Borcherng S, Chung-Ming C: Effects of baicalin on the gene expression of surfactant protein A (SP-A) in lung adenocarcinoma cell line H441. *Planta Med*, 69: 300-304, 2003.

- Kushner I: Regulation of the acute phase response by cytokines. *Perspect Biol Med*, 36: 611-622, 1993.
- Kuwahara I, Lillehoj EP, Lu W, Singh IS, Isohama Y, Miyata T, Kim KC: Neutrophil elastase induces *IL-8* gene transcription and protein release through p38/NF- $\kappa$ B activation via EGFR transactivation in a lung epithelial cell line. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 291: L407-L416, 2006.
- Lahti M, Löfgren J, Marttila R, Renko M, Käävuniemi T, Haataja R, Rämetsä M, Hallman M: Surfactant Protein D Gene Polymorphism Associated with Severe Respiratory Syncytial Virus Infection. *Pediatr Res*, 6, 2002.
- Lakowicz JR i Maliwal BP: Oxygen quenching and fluorescence depolarization of tyrosine residues in proteins. *J Biol Chem*, 258 (8): 4794-4801, 1983.
- Lakowicz JR i Thompson RB: Differential polarized phase fluorometric studies of phospholipid bilayers under high hydrostatic pressure. *Biochim Biophys Acta*, 732(2): 359-371, 1983.
- Larsen JJ, Hansen JM, Olsen NV, Galbo H, Dela F: The effect of altitude hypoxia on glucose homeostasis in men. *J Physiol*, 504: 241-249, 1997.
- Lawson PR, Perkins VC, Holmskov U, Reid KBM: Genomic organization of the mouse gene for lung surfactant protein D. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 20: 953-963, 1999.
- Lazarus R, Sparrow D, Weiss ST: Baseline ventilatory function predicts the development of higher levels of fasting insulin and fasting insulin resistance index: the Normative Aging Study. *Eur Respir J*, 12: 641-645, 1998.
- Lee LG, Conell CR, Bloch W: Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Research*, 21: 3761-3766, 1993.
- Lefèbvre PJ: Biosynthesis, secretion, and action of glucagon. *International TextBook of Diabetes Mellitus*, Third Edition: 183-190, 2004.
- Lehrer RI i Ganz T: Defensins: endogenous antibiotic peptides from human leukocytes. *Ciba Found Symp*, 171: 276-290, 1992.
- Lehrer RI i Ganz T: Defensins of vertebrate animals. *Curr Opin Immunol*, 14: 96-102, 2002.
- Lehrer RI, Ganz T, Szklarek D, Selsted ME: Modulation of the in vitro candidacidal activity of human neutrophil defensins by target cell metabolism and divalent cations. *J Clin Invest*, 81: 1829-1835, 1988.
- Lehrer RI, Lichtenstein A, Ganz T: Defensins: Antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. *Annu Rev Immunol*, 11: 105-128, 1993.
- Lehto M, Wipemo C, Ivarsson SA, Lindgren C, Lipsanen-Nyman M, Weng J, Wibell L, Widén E, Tuomi T, Groop L: High frequency of mutations in MODY and mitochondrial genes in Scandinavian patients with familial early-onset diabetes. *Diabetologia*, 42: 1131-1137, 1999.
- Lesur O, Bernard A, Begin RO: Clara cell protein (CC16) and surfactant associated protein A (SP-A) in asbestos-exposed workers. *Chest*, 109: 43-48, 1996.

- Leth-Larsen R, Floridon C, Nielsen O, Holmskov U: Surfactant protein D in the female genital tract. *Mol Hum Reprod*, 10: 149-154, 2004.
- Leth-Larsen R, Garred P, Jensenius H, Meschi J, Hartshorn K, Madsen J, Tornøe I, Madsen H.O, Sørensen G, Crouch G, Holmskov U: A Common Polymorphism in the *SFTPD* Gene Influences Assembly, Function, and Concentration of Surfactant Protein D. *J Immunol*, 174: 1532-1538, 2005.
- Leth-Larsen R, Nordenbaek C, Tornøe I, Moeller V, Schlosser A, Koch C, Teisner B, Junker P, Holmskov U: Surfactant protein D (SP-D) serum levels in patients with community-acquired pneumonia. *Clin Immunol*, 108: 29-37, 2003.
- Lichtenstein A, Ganz T, Selsted ME, Lehrer RI: *In vitro* tumor cell cytotoxicity mediated by peptide defensins of human and rabbit granulocytes. *Blood*, 68: 1407-1410, 1986.
- Lin Y, Berg AH, Iyengar P, Lam TK, Giacca A, Combs TP, Rajala MW, Du X, Rollman B, Li W, Hawkins M, Barzilai N, Rhodes CJ, Fantus IG, Brownlee M, Scherer PE: The hyperglycemia-induced inflammatory response in adipocytes: the role of reactive oxygen species. *J Biol Chem*, 280: 4617-4626, 2005.
- Lindsay RS, Funahashi T, Hanson RI, Matsuzawa Y, Tanaka S, Tataranni PA, Knowler WC, Krakoff J: Adiponectin and development of type 2 diabetes in the Pima Indian population. *Lancet*, 360: 57-58, 2002.
- Linzmeier R, Ho CH, Ganz T: A 450-kb contig of defensin genes on human chromosome 8p23. *Gene*, 233: 205-211, 1999.
- Linzmeier R, Michaelson D, Liu L, Ganz T: The structure of neutrophil defensin genes. *FEBS Lett*: 321:267-273, 1993.
- Liu L, Wang L, Jia HP, Zhao C, Heng HH, Schutte BC, et al.: Structure and mapping of the human beta-defensin HBD-2 gene and its expression at sites of inflammation. *Gene*, 222: 237-244, 1998.
- Liu L, Zhao C, Heng HH, Ganz T: The human  $\beta$ -defensin-1 and  $\alpha$ -defensins are encoded by adjacent genes: two peptide families with differing disulfide topology share a common ancestry. *Genomics*, 43: 316-320, 1997.
- Livak KJ, Flood SJA, Marmaro J, Giusti W, Deetz K: Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detection PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods and Applications*, 4: 357-362, 1995.
- Lönnqvist F, Thörne A, Nilsson K, Hoffstedt J, Arner P: A pathogenetic role of visceral  $\beta_3$ -adrenoreceptors in obesity. *J Clin Invest*, 95: 1109-1116, 1995.
- López-Bermejo A, Chico-Julía B, Fernández-Balsells M, Recasens M, Esteve E, Casamitjana R, Ricart W, Fernández-Real JM: Serum visfatin increases with progressive  $\beta$ -cell deterioration. *Diabetes*, 55: 2871-2875, 2006.
- Love-Gregory LD, Wasson J, Ma J, Jin CH, Glaser B, Suarez BK, Permutt MA: A common polymorphism in the upstream promoter region of the hepatocyte nuclear factor-4 alpha gene on chromosome 20q is associated with type 2 diabetes and appears to contribute to the evidence for linkage in an ashkenazi jewish population. *Diabetes*, 53: 1134-1140, 2004.

- Lu J, Teh C, Kishore U, Reid KBM: Collectins and ficolins: sugar pattern recognition molecules of the mammalian innate immune system. *Biochim Biophys Acta*, 1572: 387-400, 2002.
- Lubman RL, Kim KJ, Crandall ED: Alveolar epithelial barrier properties. In Crystal RG, West JB, Weibel ER, Barnes PJ, editors. *The Lung: Scientific Foundations*. Lippincott-Raven, Philadelphia, 585-602, 1996.
- Mackewicz CE, Yuan J, Tran P, Diaz L, Mack E, Selsted ME, Levy JA:  $\alpha$ -Defensins can have anti-HIV activity but are not CD8 cell anti-HIV factors. *AIDS* 17: F23-F32, 2003.
- MacNee W, Wiggs B, Belzberg AS, Hogg JC: The effect of cigarette smoking on neutrophil kinetics in human lungs. *N Engl J Med*, 321: 924-928, 1989.
- MacNeill C, Umstead TM, Phelps DS, Lin Z, Floro J, Shearer DA, Weisz J: Surfactant protein A, an innate immune factor, is expressed in the vaginal mucosa and is present in vaginal lavage fluid. *Immunology*, 111: 91-99, 2004.
- Madan T, Eggleton P, Kishore U, Strong P, Aggrawal SS, Sarma PU, Reid KBM: Binding of pulmonary surfactant proteins A and D to *Aspergillus fumigatus* conidia enhances phagocytosis and killing by human neutrophils and alveolar macrophages. *Infect Immunol*, 65: 3171-3179, 1997.
- Madan T, Kishore U, Shah A, Eggleton P, Strong P, Wang JY, Aggrawal SS, Sarma PU, Reid KBM: Lung surfactant proteins A and D can inhibit specific IgE binding to the allergens of *Aspergillus fumigatus* and block allergen-induced histamine release from human basophils. *Clin Exp Immunol*, 110: 241-249, 1997.
- Madan T, Kishore U, Singh M, Strong P, Hussain EM, Reid KBM, Sarma PU: Protective role of lung surfactant protein D in a murine model of invasive pulmonary aspergillosis. *Infect Immunol*, 69: 2728-2731, 2001a.
- Madan T, Kishore U, Singh M, Strong P, Clark H, Hussain EM, Reid KBM, Sarma PU: Surfactant proteins A and D protect mice against pulmonary hypersensitivity induced by *Aspergillus fumigatus* antigens and allergens. *J Clin Invest*, 107: 467-475, 2001b.
- Madan T, Reid KBM, Singh M, Sarma PU, Kishore U: Susceptibility of mice genetically deficient in SP-A or SP-D gene to pulmonary hypersensitivity induced by antigens and allergens of *Aspergillus fumigatus*. *J Immunol*, 174: 6943-6954, 2005.
- Madsen J, Klein A, Tornoe I, Skjodt K, Koch C, Homskov U: Localization of lung surfactant protein D (SP-D) on mucosal surfaces in human tissues. *J Immunol*, 164: 5866-5870, 2000.
- Madsen J, Tornoe I, Nielsen O, Koch C, Steinhilber W, Holmskov U: Expression and localization of lung surfactant protein A in human tissues. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 29: 591-597, 2003a.
- Madsen J, Tornoe I, Nielsen O, Lausen M, Krebs I, Mollenhauer J, Kollender G, Poustka A, Skjodt K, Holmskov U: CRP-ductin, the mouse homologue of gp-340/deleted in malignant brain tumors 1 (DMBT1), binds gram-positive and gram-negative bacteria and interacts with lung surfactant protein D. *Eur J Immunol*, 33: 2327-2336, 2003b.

- Maeda S, Abe A, Makino K, Kawade M: Transient changes in serum lipoprotein(a) as an acute phase reactant. *Atherosclerosis*, 879: 145-150, 1989.
- Maemoto A, Qu X, Rosengren KJ, Tanabe H, Henschen-Edman A, Craik DJ, Ouellette AJ: Functional analysis of the  $\alpha$ -defensin disulfide array in mouse cryptdin-4. *J Biol Chem*, 279: 44188-44196, 2004.
- Makowski L, Boord JB, Maeda K, Babaev VR, Uysal KT, Morgan MA, Parker RA, Suttles J, Fazio S, Hotamisligil GS, Linton MF: Lack of macrophage fatty-acid-binding protein aP2 protects mice deficient in apolipoprotein E against atherosclerosis. *Nat Med*, 7: 699-705, 2001.
- Male D, Cooke A, Owen M, Trowsdale J, Champion B: *Advanced Immunology*, Third Edition. London: Mosby, 1996.
- Malecki MT i Klupa T: Type 2 diabetes mellitus: from genes to disease. *Pharmacol Rep*, 57: 20-32, 2005.
- Malherbe DC, Erpenbeck VJ, Abraham SN, Crouch EC, Hohlfeld JM i col.: Surfactant protein D decreases pollen induced IgE-dependent mast cell degranulation. *AM J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 289: L856-L866, 2005.
- Malhotra R, Thiel S, Reid KBM, Sim RB: Human leukocyte C1q receptor binds other soluble proteins with collagen domains. *J Exp Med*, 172: 955-959, 1990.
- Mallow EB, Harris A, Salzman N, Russell JP, DeBerardinis RJ, Ruchelli E. i col.: Human enteric defensins. *J Biol Chem*, 271: 4038-4045, 1996.
- Malmström R, Packard CJ, Watson TDG, Rannikko S, Caslake M, Bedford D, Stewart P, Yki-Järvinen H, Shepherd J, Taskinen MR: Metabolic basis of hypotriglyceridemic effects of insulin in normal men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 17: 1454-1464, 1997.
- Malmström R, Packard CJ, Caslake M, Bedford D, Stewart P, Yki-Järvinen H, Shepherd J, Taskinen MR: Defective regulation of triglyceride metabolism by insulin in the liver in NIDDM. *Diabetologia*, 40: 454-462, 1997.
- Malmström R, Packard CJ, Caslake M, Bedford D, Stewart P, Yki-Järvinen H, Shepherd J, Taskinen MR: Effects of insulin and acipimox on VLDL1 and VLDL2 apolipoprotein B production in normal subjects. *Diabetes*, 47: 779-787, 1998.
- Manicardi V, Camellini L, Bellodi G, Coscelli C, Ferrannini E: Evidence for an association of high blood pressure and hyperinsulinemia in obese man. *J Clin Endocrinol Metab*, 62: 1302-1304, 1986.
- Manson JE, Ajani UA, Liu S, Nathan DM, Hennekens CH: A prospective study of cigarette smoking and the incidence of diabetes mellitus among US male physicians. *Am J Med*, 109: 538-542, 2000.
- Martin TR: Recognition of bacterial endotoxin in the lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 23: 128-132, 2000.
- Mathews M, Jia HP, Guthmiller JM, Losh G, Graham S, Johnson GK, Tack BF, McCray PB Jr: Production of  $\beta$ -defensin antimicrobial peptides by the oral mucosa and salivary glands. *Infect Immun*, 67. 2740-2745, 1999.

- Matsubara M, Maruoka S, Katayose S: Decreased plasma adiponectin concentrations in women with dyslipidemia. *J Clin Endocrinol Metab*, 87: 2764-2769, 2002.
- McCarthy MI: Susceptibility gene discovery for common metabolic and endocrine traits. *J Mol Endocrinol*, 28: 1-17, 2002.
- McCarthy MI i Froguel P: Genetic approaches to the molecular understanding of type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 283: 217-225, 2002.
- McCormack FX, Damodarasamy M, Elhalwagi BM: Deletion mapping of N-terminal domains of surfactant protein A. The N-terminal segment is required for phospholipid aggregation and specific inhibition of surfactant secretion. *J Biol Chem*, 274: 3173-3181, 1999.
- McCormack FX, Gibbons R, Ward SR, Kuzmenko A, Wu H, Deepe JrGS: Macrophage-independent fungicidal action of the pulmonary collectins. *J Biol Chem*, 278: 36250-36256, 2003.
- McCray PB Jr i Bertley L: Human airway epithelia express a beta-defensin. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 16: 343-349, 1997.
- McGarry JD i Foster DW: Glucagon and ketogenesis. In Lefèbvre PJ (ed), *Glucagon, Vol I Springer*, 383-398, 1983.
- McNeely TB i Coonrod JD: Aggregation and opsonization of type A but not type B *Hemophilus influenzae* by surfactant protein A. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 11: 114-122, 1994.
- Megia A, Gallart L, Fernández-Real JM, Vendrell J, Simón I, Gutiérrez C, Richart C: Mannose-binding lectin gene polymorphism is associated with gestational diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*, 89: 5081-5087, 2004.
- Mehta KD, Radomska-Pandya A, Kapoor GS, Dave B, Atkins BA: Critical role of diacylglycerol- and phospholipid-regulated protein kinase C epsilon in induction of low-density lipoprotein receptor transcription in response to depletion of cholesterol. *Mol Cell Biol*, 22: 3783-3793, 2002.
- Merkel PA, Simonson DC, Amiel SA, Plewe G, Sherwin RS, Pearson HA, Tamborlane WV: Insulin resistance and hyperinsulinemia in patients with thalassemia major treated by hypertransfusion. *N Engl J Med*, 318: 809-814, 1988.
- Miakotina OL, Dekowski SA, Snyder JM: Insulin inhibits surfactant protein A and B gene expression in the H441 cell line. *Biochim Biophys Acta*, 142: 60-70, 1998.
- Miakotina OL i Snyder JM: TNF- $\alpha$  inhibits SP-A gene expression in lung epithelial cells via p38 MAPK. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 283: L418-L427, 2002.
- Michel OJ, Kips J, Duchateau J, Vertongen F, Robert L, Collet H, Puwels R, Sergysels R: Severity of asthma is related to endotoxin in house dust. *Am J Respir Crit Care Med*, 154: 1641-1646, 1996.
- Middleton-Price HR, van der Berghe JA, Scott J, Knott TJ, Malcolm S: Regional chromosomal localization of APOA2 to 1q21-1q23. *Human Genet*, 79: 282-285, 1988.

- Miller C, Bartges J, Cornelius L, Norton N, Barton M: Tumor necrosis factor-alpha levels in adipose tissue of lean and obese cats. *J Nutr*, 128: 2751-2752, 1998.
- Milner S, Poindexter B, Buja M, Smith E, Bick R: Localization of human beta-defensin in normal and burns skin by fluorescence deconvolution microscopy. *Burns*, 1: 1-4, 2002.
- Misbin RI, Almira EC, Cleman MW: Insulin degradation in serum of a patient with apparent insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 52: 177-180, 1981.
- Misumi T, Tanaka T, Mikawa K, Nishina K, Morikawa O, Obara H: Effects of sivelestat, a new elastase inhibitor, on IL-8 and MCP-1 production from stimulated human alveolar epithelial type II cells. *J Anesth*, 20: 159-165, 2006.
- Miyakawa Y, Ratnakar P, Costello M, Catanzaro A: In vitro activity of the antimicrobial peptide human and rabbit defensins and porcine leukocyte protegin against *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*, 64. 926-932, 1996.
- Miyamura K, Malhotra R, Hoppe HJ, Reid KBM, Phizackerley PJ, Mcpherson P, Lopez-Bernal A: Surfactant proteins A (SP-A) and D (SP-D): levels in human amniotic fluid and localization in the fetal membranes. *Biochim Biophys Acta*, 1210: 303-307, 1994.
- Moczulski DK, Grzeszczak W, Gawlik B: Role of hemochromatosis C282Y and H63D mutations in HFE gene in development of type 2 diabetes and diabetic nephropathy. *Diabetes Care*, 24: 1187-1191, 2001.
- Modan M, Halkin H, Karasik A, Lusky A: Elevated serum uric acid: a facet of hyperinsulinemia. *Diabetologia*, 30: 713-718, 1987.
- Moglia BB i Phelps DS: Changes in surfactant protein A mRNA levels in a rat model of insulin-treated diabetic pregnancy. *Pediatr Res*, 39: 241-247, 1996.
- Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, Katz DR, Miles JM, Yudkin JS, Klein S, Coppel SW: Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but no tumor necrosis factor-alpha, in vivo. *J Clin Endocrinol Metab*, 82: 4196-4200, 1997.
- Moirand R, Mortaji AM, Loreal O, Paillard F, Brissot P, Deugnier Y: A new syndrome of liver iron overload with normal transferrin saturation. *Lancet*, 349: 95-97, 1997.
- Moller DE i Flier JS: Insulin resistance. Mechanisms, syndromes, and implications. *N Engl J Med*, 325: 938-947, 1991.
- Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, Soos MA, Rau H, Wareham NJ, Sewter CP, Digby JE, Mohammed SN, Hurst JA, Cheetham CH, Earley AR, Barnett AH, Prins JB, O'Rahilly S: Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature*, 387: 903-908, 1997.
- Moon SK, Chan BY, Kim CH. ERK 1/2 mediates TNF- $\alpha$ -induced matrix metalloproteinase-9 expression in human vascular smooth muscle cells via the regulation of NF- $\kappa$ B and AP-1: involvement of the Ras dependent pathway. *J Cell Physiol*, 198: 417-427, 2004.
- Morgensen CE: Microalbuminuria predicts clinical proteinuria and early mortality in maturity-onset diabetes. *New Engl J Med*, 310: 356-360, 1984.
- Morgensen CE i Christensen CK: Predicting diabetic nephropathy in insulin dependent patients. *New Engl J Med*, 311: 89-93, 1984.

- Muller G, Ertl J, Gerl M, Preibisch G: Leptin impairs metabolic actions of insulin in isolated rat adipocytes. *J Biol Chem*, 272: 10585-10593, 1997.
- Müller F-MC, Luman CA, Walsh TJ: Antimicrobial peptides as potential new antifungals. *Mycoses* 42 [Suppl 2]: 77-82, 1999.
- Murakami S, Iwaki D, Mitsuzawa H, Sano H, Takahashi H, Boelker DR, Akino T, Kuroki Y: Surfactant protein A inhibits peptidoglycan-induced tumor necrosis factor- $\alpha$  secretion in U937 cells and alveolar macrophages by direct interaction with Toll-like receptor 2. *J Biol Chem*, 277: 6830-6837, 2002.
- Murphy CJ, Foster BA, Mannis MJ, Selsted ME, Reid TW: Defensins are mitogenic for epithelial cells and fibroblasts. *J Cell Physiol*, 155: 408-413, 1993.
- Murphy KG i Bloom SR: Are all fats created equal? *Nat Med*, 12(1): 32-33, 2006.
- Murray E, Khamri W, Walker MM, Eggleton P, Morgan AP, Ferris JA, Knapp S, Karim QN, Worku M, Srong P, Reid KBM, Thursz M: Expression of surfactant protein D i the human gastric mucosa and during *Helicobacter pylori* infection. *Infect Immunol*, 70: 1481-1487, 2002.
- Mykkänen L, Haffner SM, Kuusisto J, Pyörälä K, Laakso M: Microalbuminuria precedes the development of NIDDM. *Diabetes*, 43: 552-557, 1994.
- Nadesalingam J, Bernal AL, Dodds AW, Willis AC, Mahoney DJ, Day AJ, Reid KBM, Palaniyar N: Identification and characterization of a novel interaction between pulmonary surfactant protein D and decorin. *J Biol Chem*, 278: 25678-25687, 2003.
- Nagy I, Pivarcsi A, Koreck A, Széll M, Urbán E, Kemény L: Distinct strains of *Propionibacterium acnes* induce selective human  $\beta$ -defensin-2 and interleukin-8 expression in human keratinocytes through Toll-like receptors. *J Invest Dermatol*, 124: 931-938, 2005.
- Nassar T, Akkawi S, Bar-Shavit R, Haj-Yehia A, Bdeir K, Al-Mehdi AB, Tarshis M, Higazi AA: Human alpha-defensin regulates smooth muscle cell contraction: a role for low-density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor. *Blood*, 100: 4026-4032, 2002.
- Nassar T, Akkawi S, Shina A, Haj-Yehia A, Bdeir K, Tarshis M, Heyman SN, Higazi AA: In vitro and in vivo effects of tPA and PAI-1 on blood vessel tone. *Blood*, 103: 897-902, 2004.
- Napomuceno RR, Henschen-Edman AH, Burgess WH, Tenner AJ: cDNA cloning and primary structure analysis of C1qRp, the human C1q/MBL/SPA receptor that mediates enhances phagocytosis in vitro. *Immunity*, 6: 119-129, 1997.
- Newman B, Selby JV, King MC, Slemenda C, Fabsitz R, Friedman GD: Concordance for type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in male twins. *Diabetologia*, 30: 763-768, 1987.
- Ni M, Evans DJ, Hawgood S, Anders EM, Sack RA, Fleiszig SM: Surfactant protein D is present in human tear fluid and the cornea and inhibits epithelial cell invasion by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immunol*, 73: 2147-2156, 2005.

- Niederau C, Berger M, Stremmel W, Starke A, Strohmeyer G, Ebert R, Siegel E, Creutzfeldt W: Hyperinsulinemia in non-cirrhotic hemochromatosis: Impaired hepatic insulin degradation? *Diabetologia*, 26: 441-444, 1984.
- Niskanen L i Laakson M: Insulin resistance is related to albuminuria in patients with type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Metabolism*, 42: 1541-1545, 1993.
- Niskanen L, Uusitupa M, Sarlund H, Siitonen O, Voutilainen E, Penttilä I, Pyörälä K: Microalbuminuria predicts the development of serum lipoprotein abnormalities favoring atherogenesis in newly diagnosed type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia*, 33: 237-243, 1990.
- Niyonsaba F, Hirata M, Ogawa H, Nagaoka I: Epithelial cell-derived antibacterial peptides human  $\beta$ -defensins and cathelicidin: multifunctional activities on mast cells. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 2: 224-231, 2003.
- Nomori H, Horio H, Fuyuno G, Kobayashi R, Morinaga S, Suemasu K: Serum surfactant protein A levels in healthy individuals are increased in smokers. *Lung*, 176: 355-361, 1998.
- Norwitz ER, Bernal AL, Starkey PM: Tumor necrosis factor- $\alpha$  selectively stimulates prostaglandin F<sub>2 $\alpha$</sub>  production by macrophages in human term decidua. *Am J Obstet Gynecol*, 167: 815-820, 1992.
- Norwitz ER, Starkey PM, Bernal AL: Prostaglandin D<sub>2</sub> production by term human decidua: cellular origins defined using flow cytometry. *Obstet Gynecol*, 80: 440-445, 1992.
- Nosadini R, Solini A, Sambataro M, Cipollina MR, Trevisan R, Duner E, Strazzabosco M, Barzon I, Brocco E, Velussi M, Crepaldi G: Relationships among insulin resistance, hypertension and microalbuminuria in non-insulin-dependent diabetes. Role of cell ion handling. *Diabetes*, 41: 62.
- Nuutila P, Knuuti J, Mäki M, Laine H, Ruotsalainen U, Teräs M, Haaparanta M, Solin O, Yki-Järvinen H: Gender and insulin sensitivity in the heart and in skeletal muscles. Studies using positron emission tomography. *Diabetes*, 44: 31-36, 1995.
- Oberley RE, Ault KA, Neff TL, Khubchandani KR, Crouch EC, Snyder JM: Surfactant proteins A and D enhance the phagocytosis of *Chlamydia* into THP-1 cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 287: L296-L306, 2004a.
- Oberley RE, Goss KL, Ault KA, Crouch EC, Snyder JM: Surfactant protein D is present in the human female reproductive tract and inhibits *Chlamydia trachomatis* infection. *Mol Hum Reprod*, 10: 861-870, 2004b.
- Oberley RE i Snyder JM: Recombinant human SP-A1 and SP-A2 proteins have different carbohydrate-binding characteristics. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 284: L871-L881, 2003.
- O'Brien RM i Granner DK: Regulation of gene expression by insulin. *Biochem J*, 278: 609-619, 1991.
- Ogasawara Y, Kuroki Y, Akino T: Pulmonary surfactant protein D specifically binds to phosphatidylinositol. *J Biol Chem*, 267: 21244-21249, 1992.

- Ogata K, Linker BA, Zuberi RI, Ganz T, Catanzaro S: Activity of defensins of human neutrophilic granulocytes against *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*. *Infect Immune*, 60: 4720-4725, 1992.
- Ogden CA, deCathelineau A, Hoffmann PR, Bratton D, Ghebrehiwet B, Fadok VA, Henson PM: C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells. *J Exp Med*, 194: 781-795, 2001.
- Ognjanovic S, Bao S, Yamamoto SY, Garibay-Tupas J, Samal B, Bryant-Greenwood GD: Genomic organization of the gene coding for human pre-B-cell colony enhancing factor and expression in human fetal membranes. *J Mol Endocrinol*, 26: 107-117, 2001.
- Ognjanovic S i Bryant-Greenwood GD: Pre-B-cell colony-enhancing factor, a novel cytokine of human fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol*, 187: 1051-1058, 2002.
- Ohya M, Nishitani C, Sano H, Yamada C, Mitsuzawa H, Shimizu T, Saito T, Smith K, Crouch E, Kuroki Y: Human pulmonary surfactant protein D binds the extracellular domains of toll-like receptors 2 and 4 through the carbohydrate recognition domain by a mechanism different from its binding to phosphatidylinositol and lipopolysaccharide. *Biochemistry*, 45: 8657-8664, 2006.
- O'Neil DA, Porter EM, Elawaut D, Anderson GM, Eckman L, Ganz T: Expression and regulation of HBD-1 and HBD-2 in intestinal epithelium. *J Immunol*, 163: 6718-6724, 1999.
- Ong PY, Ohtake T, Brandt C, Strickland I, Boguniewicz M, Ganz T, Gallo RL, Leung DYM: Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. *N Engl J Med*, 347: 1151-1160, 2002.
- Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E, Tuncman G, Görgün C, Glimcher LH, Hotamisligil GS: Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science*, 306: 457-461, 2004.
- Ozawa K, Miyazaki M, Matsuhisa M, Takano K, Nakatani Y, Hatazaki M, Tamatani T, Yamagata K, Miyagawa J, Kitao Y, Hori O, Yamasaki Y, Ogawa S Ozawa K: The endoplasmic reticulum chaperone improves insulin resistance in type 2 diabetes. *Diabetes*, 54: 657-663, 2004.
- Paananen R, Sormunen R, Glumoff V, van Eijk M, Hallman M: Surfactant proteins A and D in Eustachian tube epithelium. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 281: L660-L667, 2001.
- Page RA i Malik AN: Elevated levels of beta defensin-1 mRNA in diabetic kidneys of GK rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 310: 513-521, 2003.
- Pajukanta P, Lilja HE, Sinsheimer JS, Cantor RM, Lusic AJ, Gentile M, Duan XJ. et al.: Familial combined hyperlipidemia is associated with upstream transcription factor 1 (USF1). *Nat Genet*, 36: 371-376, 2004.
- Panyutich AV, Panyutich EA, Krapivin VA, Baturevich EA, Ganz T: Plasma defensin concentrations are elevated in patients with septicemia or bacterial meningitis. *J Lab Clin Med*, 122: 202-207, 1993.

- Parving HH, Oxenboll B, Svendsen PA, Sandahl-Christensen J, Andersen AR: Early detection of patients at risk of developing diabetic nephropathy. A longitudinal study of urinary albumin excretion. *Acta Endocrinol*, 100: 550-555, 1982.
- Pastva AM, Wright JR, Williams KL: Immunomodulatory roles of surfactant proteins A and D. Implications in lung disease. *Proc Am Thorac Soc*, 3: 252-257, 2007.
- Patti ME i Kahn CR: The insulin-receptor—a critical link in glucose homeostasis and insulin action. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*, 9: 89-109, 1998.
- Pauschinger M, Bowles NE, Fuentes-Garcia FJ, Pham V, Kühl U, Schwimmbeck PL, Schultheiss HP, Towbin JA: Detection of adenoviral genome in the myocardium of adult patients with idiopathic left ventricular dysfunction. *Circulation*, 99: 1348-1354, 1999.
- Paz K, Hemi R, LeRoith D, Karasik A, Elhanany E, Kanety H, Zick Y: A molecular basis for insulin resistance. Elevated serine/threonine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 inhibits their binding to the juxtamembrane region of the insulin receptor and impairs their ability to undergo insulin-induced tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem*, 272: 29911-29918, 1997.
- Peiris AN, Struve MF, Mueller RA, Lee MB, Kissebah AH: Glucose metabolism in obesity: influence of body fat distribution. *J Clin Endocrinol Metab*, 67: 760-767, 1988.
- Persson A, Chang D, Crouch E: Surfactant protein D is a divalent cation-dependent carbohydrate-binding protein. *J Biol Chem*, 265: 5755-5760, 1990.
- Phokela SS, Peleg S, Moya FR, Alcorn JL: Regulation of human pulmonary surfactant protein gene expression by 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 289: L617-L626, 2005.
- Piboonpocanun S, Chiba H, Mitsuzawa H, Martin W, Murphy RC, Harbeck RJ, Voelker DR: Surfactant protein A binds *Mycoplasma pneumoniae* with high affinity and attenuates its growth by recognition of disaturated phosphatidylglycerols. *J Biol Chem*, 280(1): 9-17, 2005.
- Pickup JC: Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 27: 813-823, 2004.
- Pickup JC i Crook MA: Is type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system. *Diabetologia*, 41: 1241-1248, 1998.
- Pickup JC, Mattock MB, Crook MA, Chusney GD, Burt D, Fitzgerald AP: Serum sialic acid concentration and coronary heart disease in NIDDM. *Diabetes Care*, 18: 1100-1103, 1995.
- Pikaar JC, Voorhout WF, van Golde LM, Verhoef J, Van Strijp JA, van Iwaarden JF: Opsonic activities of surfactant proteins A and D in phagocytosis of gram-negative bacteria by alveolar macrophages. *J Infect Dis*, 172: 481-489.
- Pivarcsi A, Nagy I, Koreck A, Kis K, Kenderessy-Szabo A, Szell M, Dobozy A, Kemeny L: Microbial compounds induce the expression of pro-inflammatory cytokines, chemokines and human  $\beta$ -defensin-2 in vaginal epithelial cells. *Microbes Infect*, 7: 1117-1127, 2005.
- Plum L, Schubert M, Bruning JC: The role of insulin receptor signaling in the brain. *Trends Endocrinol Metab*, 16: 59-65, 2005.

- Porter E, Yang H, Yavagal S, Preza GC, Murillo O, Lima H, Greene S, Mahoozi L, Klein-Patel M, Diamond G, Gulati S, Ganz T, Rice PA, Quayle AJ: Distinct defensin profiles in *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* urethritis reveal novel epithelial cell-neutrophil interactions. *Infect Immun*, 73: 4823-4833, 2005.
- Porter EM, Van Dam E, Valore EV, Ganz T: Broad-spectrum antimicrobial activity of human intestinal defensin 5. *Infect Immun*, 65: 2396-2601, 1997.
- Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM: C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA*, 286: 327-334, 2001.
- Proud D, Sanders SP, Wiehler S: Human rhinovirus infection induces airway epithelial cell production of human  $\beta$ -defensin 2 both *in vitro* and *in vivo*. *J Immunol*, 172: 4637-4645, 2004.
- Pryhuber GS, Hull WM, Fink I, McMahan MJ, Whitsett JA: Ontogeny of surfactant proteins A and B in human amniotic fluid as indices of fetal lung maturity. *Pediatr Res*, 30: 597-605, 1991.
- Pryhuber GS, O'Reilly MA, Clark JC, Hull WM, Fink I, Whitsett JA: Phorbol ester inhibits surfactant protein SP-A and SP-B expression. *J Biol Chem*, 265: 20822-20828, 1990.
- Pugin J, Ulevitch RJ, Tobias PS: Activation of endothelial cells by endotoxin: direct versus indirect pathways and the role of CD14. *Prog Clin Biol Res*, 392: 369, 1994.
- Quayle AJ, Porter EM, Nussbaum AA, Wang YM, Brabec C: Gene expression, immunolocalization and secretion of human defensin-5 in human female reproductive tract. *Am J Pathol*, 152: 1247-1258, 1998.
- Quinones GA, Natali A, Baldi S, Frascerra S, Sanna G, Ciociaro D, Ferrannini E: Effect of insulin on uric acid excretion in humans. *Am J Physiol*, 268: 1-5, 1995.
- Quiñones-Mateu ME, Lederman MM, Feng Z, Chakraborty B, Weber J, Rangel HR, Marotta ML, Mirza M, Jiang B, Kiser P, Medvik K, Sieg SF, Weinberg A: Human epithelial  $\beta$ -defensins 2 and 3 inhibit HIV-1 replication. *AIDS*, 17: F39-F48, 2003.
- Quintero OA, Korfhagen TR, Wright FR: Surfactant protein A regulates surfactant phospholipid clearance after LPS-induced injury *in vivo*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 283: 76-85, 2002.
- Rahbar S: The discovery of glycosylated hemoglobin: a major event in the study of nonenzymatic chemistry in biological systems. *Ann N Y Acad Sci*, 1043- 9-19, 2005.
- Ramadurai SM, Nielsen HC, Chen Y, Hatzis D, Sosenko IR: Differential effects *in vivo* of thyroid hormone on the expression of surfactant phospholipid, surfactant protein mRNA and antioxidant enzyme mRNA in fetal rat lung. *Exp Lung Res*, 24: 641-657, 1998.
- Ramage L, Jones AC, Whelan CJ: Induction of apoptosis with tobacco smoke and related products in A549 lung epithelial cells *in vitro*. *Bio Med Central*, 3: 3, 2006.
- Rankinen T, Perusse L, Weisnagel SJ, Snyder EE, Chagnon YC, Bouchard C: The human obesity gene map: the 2001 update. *Obes Res*, 10: 196-243, 2002.
- Rask-Madsen C i King GL: Proatherosclerotic mechanisms involving protein kinase C in diabetes and insulin resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25: 487-496, 2005.

- Rayani HH, Gewolb IH, Floros J: Glucose decreases steady state mRNA content of hydrophobic surfactant proteins B and C in fetal rat lung explants. *Exp Lung Res*, 25: 69-79, 1999.
- Reading PC, Allison J, Crouch EC, Anders EM: Increased susceptibility of diabetic mice to influenza virus infection: compromise of collectin-mediated host defense of the lung by glucose?. *J Virol*, 72: 6884-6887, 1998.
- Reading PC, Morey LS, Crouch EC, Anders EM: Collectin-mediated antiviral host defense of the lung: evidence from influenza virus infection of mice. *J Virol*, 71: 8204-8212, 1997.
- Recasens M, Ricart W, Fernández-Real JM: Obesidad e inflamación. *Rev Med Univ Navarra*, vol 48, 2: 49-54, 2004.
- Reid MF i Wright JR: Pulmonary surfactant proteins A and D directly suppress CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> cell function: evidence for two shared mechanisms. *J Immunol*, 169: 5844-5850, 2002.
- Revollo JR, Körner A, Mills KF, Satoh A, Wang T, Garten A, Dasgupta B, Sasaki Y, Wolberger C, Townsend RR, Milbrandt J, Kiess W, Imai S: Nampt/PBEF/visfatin regulates insulin secretion in  $\beta$  cells as a systemic NAD biosynthetic enzyme. *Cell Metab*, 6(5): 363-375, 2007.
- Rich SS: Mapping genes in diabetes: genetic epidemiological perspective. *Diabetes*, 39: 1315-1319, 1990.
- Riqué Rebull S: Estudi molecular i funcional del receptor d'insulina en síndromes de resistència a la insulina. *Tesi Doctoral* Universitat Autònoma de Barcelona. Facultat de ciències. Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, 2001.
- Robbins RA i Rennard SI: Biology of airway epithelial cells. En Crystal RG, West JB, Weibel ER, Barnes PJ, editors. *The Lung: Scientific Foundations*. Lippincott-Raven, Philadelphia, 445-457, 1997.
- Robert MF, Neff RK, Hubbell JP, Taeusch HW, Avery ME: Association between maternal diabetes and the respiratory-distress syndrome in the newborn. *N Engl J Med*, 294: 357-360, 1976.
- Robin M, Dong P, Hermans C, Bernard A, Bersten AD, Doyle IR: Serum levels of CC16, SP-A and SP-B reflects tobacco-smoke exposure in asymptomatic subjects. *Eur Respir*, 20: 1152-1161, 2002.
- Rodríguez-Jiménez FJ, Krause A, Schulz S, Forssmann WG, Conejo-Garcia JR, Schreeb R, i col.: Distribution of new human beta-defensin genes clustered on chromosome 20 in functionally different segments of epididymis. *Genomics*, 81: 175-183, 2003.
- Romero R, Mazor M, Brandt F, Sepulveda W, Avila C, Cotton DB, Dinarello CA: Interleukin-1 $\alpha$  and interleukin-1 $\beta$  in preterm and term human parturition. *Am J Reprod Immunol*, 27: 117-123, 1992.
- Rosenthal M, Haskell WL, Solomon R, Widström A, Reaven GM: Demonstration of a relationship between physical training and insulin-stimulated glucose utilization in normal humans. *Diabetes*, 32: 408-411, 1983.

- Rosmond R: The glucocorticoid receptor gene and its association to metabolic syndrome. *Obes Res*, 10: 1078-1076, 2002.
- Rosseau S, Guenther A, Seeger W, Lohmeyer J: Phagocytosis of viable *Candida albicans* by alveolar macrophages: lack of opsonin function of surfactant protein A. *J Infect Dis*, 175: 421-428, 1997.
- Rosseau S, Hammerl P, Maus U, Gunther A, Seeger W, Grimminger F, Lohmeyer J: Surfactant protein A down-regulates proinflammatory cytokine production evoked by *Candida albicans* in human alveolar macrophages and monocytes. *J Immunol*, 163: 4495-4502, 1999.
- Rubio S, Lacaze-Masmonteil T, Chailly-Heu B, Kahn A, Bourbon JR, Ducroc R: Pulmonary SP-A is expressed by epithelial cells of small and large intestine. *J Biol Chem*, 270: 12162-12169, 1995.
- Rust K, Bingle L, Mariencheck W, Persson A, Crouch EC: Characterization of the Human Surfactant Protein D Promoter: Transcriptional Regulation of SP-D Gene Expression by Glucocorticoids. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 14: 121-130, 1996.
- Saghizadeh M, Ong JM, Garvey WT, Henry RR, Kern PA: The expression of TNF alpha by human muscle. Relationship to insulin resistance. *J Clin Invest*, 97: 1111-1116, 1996.
- Sahly H, Ofek I, Podschun R, Brade H, He Y, Ullmann U, Crouch E: Surfactant protein D binds selectively to *Klebsiella pneumoniae* lipopolysaccharides containing mannose-rich O-antigens. *J Immunol*, 169: 3267-3274, 2002.
- Saito T, Misawa K, Kawata S: Fatty liver and non-alcoholic steatohepatitis. *Intern Med*, 46: 101-103, 2007.
- Saitoh H, Okayama H, Shimura S, Fushimi T, Masuda T, Shirato K: Surfactant protein A2 gene expression by human airway submucosal gland cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 19: 202-209, 1998.
- Saltiel AR i Kahn CR: Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, 141: 799-806, 2001.
- Saltiel AR i Pessin JE: Insulin signaling pathways in time and space. *Trends Cell Biol*, 12: 65-71, 2002.
- Salzman NH, Ghosh D, Huttner KM, Paterson Y, Bevins CL: Protection against enteric salmonellosis in transgenic mice expressing a human intestinal defensin. *Nature*, 422: 522-526, 2003.
- Samal B, Sun Y, Stearn SG, Xie C, Suggs S, McNiece I: Cloning and characterization of the cDNA encoding a novel human pre-B-cell colony enhancing factor. *Mol Cell Biol*, 14(2): 1431-1437, 1994.
- Sano H, Kuroki Y, Honma T, Ogaswara Y, Sohma H, Voelker DR, Akino T: Analysis of chimeric proteins identifies the regions in the carbohydrate recognition domains of rat lung collectins that are essential for interactions with phospholipids, glycolipids, and alveolar type II cells. *J Biol Chem*, 273: 4783-4789, 1998.

- Sano H, Kuronuma K, Kudo K, Mitsuzawa H, Sano M, i col.: Regulation of inflammation and bacterial clearance by lung collectins. *Respir*, S46-50, 2006.
- Sattar N, McCarey DW, Capell H, McInnes IB: Explaining how “high-grade” systemic inflammation accelerates vascular risk in rheumatoid arthritis. *Circulation*, 108: 2957-2963, 2003.
- Schaefer TM, Fahey JV, Wright JA, Wira CR: Innate immunity in the human female reproductive tract: antiviral response of uterine epithelial cells to the TLR3 agonist poly (I:C). *J Immunol*, 174: 992-1002, 2005.
- Schagat TL, Wofford JA, Wright JR: Surfactant protein A enhances alveolar macrophage phagocytosis of apoptotic neutrophils. *J Immunol*, 166: 2727-2733, 2001.
- Schaub B, Westlake RM, He H, Arestides R, Haley KJ, Campo M, Velasco G, Bellou A, Hawgood S, Poulain FR, Perkins DL, Finn PW: Surfactant protein D deficiency influences allergic immune responses. *Clin Exp Allergy*, 34: 1819-1826, 2004.
- Schelenz S, Malhotra R, Sim RB, Holmskov U, Bancroft GJ: Binding of host collectins to the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*: human surfactant protein D acts as an agglutinin for acapsular yeast cells. *Infect Immunol*, 63: 3360-3366, 1995.
- Schmidt MI, Duncan BB, Sharrett AR, Lindberg G, Savage PJ, Offenbacher S, Azambuja MI, Tracy RP, Heiss G: Markers of inflammation and prediction of diabetes mellitus in adults (Atherosclerosis Risk in Communities study): a cohort study. *Lancet* 353: 1649-1652, 1999.
- Schneider JJ, Unholzer A, Schaller M, Schafer-Koring M, Korting HC: Human defensins. *J Mol Med*, 83: 587-595, 2005.
- Schröder J-M: Epithelial antimicrobial peptides: innate local host response elements. *Cell Mol Life Sci*, 56: 32-46, 1999.
- Schröder J-M i Harder J: Human beta-defensin-2. *Int J Biochem Cell Biol*, 31: 645-651, 1999.
- Schultz H i Weiss JP: The bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) in infection and inflammatory disease. *Clinica Chimica Acta*, 12-23, 2007.
- Schutte B i McCray P: b-defensins in lung host defense. *Annu Rev Physiol*, 64: 709-748, 2002.
- Schwartz MW, Baskin DG, Bukowski TR, Kuijpr JL, Foster D, Lasser G, Prunkard DE, Porte Jr D, Woods SC, Seeley RJ, Weigle DS: Specificity of leptin action on elevated glucose levels and hypothalamic neuropeptide Y gene expression in ob/ob mice. *Diabetes*, 45: 531-535, 1996.
- Sell H, Eckel J, Dietze-Schroeder D: Pathways leading to muscle insulin resistance-the muscle-fat connection. *Arch Physiol Biochem*, 112(2): 105-113, 2006.
- Selsted ME, Ganz T, Lehrer RI: Primary structures of three human neutrophil defensins. *J Clin Invest*, 76: 1436-1439, 1985.
- Selsted ME i Ouellette AJ: Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. *Nat Immunol*, 6: 551-557, 2005.

- Semenza GL: Oxygen-regulated transcription factors and their role in pulmonary disease. *Respir Res*, 1: 159-162, 2000.
- Seppanen O, Glumoff V, Paananen R, Rounioja S, Hallman M: Transcription factors NF-kappaB and C/EBPdelta and IL-1-induced expression of surfactant protein A in lung explants during the perinatal period. *Biol Neonate*, 87: 152-159, 2005.
- Sesti G: Pathophysiology of insulin resistance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 20(4): 665-679, 2006.
- Sethi JK i Hotamisligil GS: The role of TNF alpha in adipocyte metabolism. *Semin Cell Dev Biol*, 10: 19-29, 1999.
- Sethi JK i Vidal-Puig A: Visfatin: the missing link between intra-abdominal obesity and diabetes?. *TRENDS in Mol Medic*, 8, 2005.
- Sha P, Basu A, Basu R, Rizza R: Impact of lack of suppression of glucagon on glucose tolerance in humans. *Am J Physiol*, 277: E283-E290, 1999.
- Sha P, Vella A, Basu A, Schwenk WF, Rizza RA: Lack of suppression of glucagon contributes to postprandial hyperglycemia in subjects with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 4053-4059, 2000.
- Shafer AI, Cheron RG, Dluhy R, Cooper B, Gleason RE, Soeldner JS, Bunn HF: Clinical consequences of acquired transfusional iron overload in adults. *N Engl J Med*, 304: 319-324, 1981.
- Shapiro DL, Livingston JN, Maniscalco WM, Finkelstein JN: Insulin receptors and insulin effects on type II alveolar epithelial cells. *Biochim Biophys Acta*, 885: 216-220, 1986.
- Sharma S, Verma I, Khuller G: Antibacteria activity of human neutrophil peptide-I against *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv *in vitro* and *ex vivo* study. *Eur Respir J*, 16: 112-117, 2000.
- Sharma S, Verma I, Khuller G: Therapeutic potential of human neutrophil peptide-I against experimental tuberculosis. *Antimicrob Agentes Chemother*, 45: 639-640, 2001.
- Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS: TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest*, 116(11): 3015-3025, 2006.
- Shih DQ i Stoffel M: Dissecting the transcriptional network of pancreatic islets during development and differentiation. *PNAS*, 4: 98, 25: 14189-14191, 2001.
- Shimizu H, Hosoda K, Mizumoto M, Kuroki Y, Sato H, Kataoka K, Hagiwara M, Fujimoto S, Akino T: Improved immunoassay for the determination of surfactant protein A (SP-A) in human amniotic fluid. *Tohoku J Exp Med*, 157: 269-278, 1989.
- Shrive AK, Tharia HA, Strong P, Kishore U, Burns I, Rizkallah PJ, Reid KBM, Greenhough T.J: High-resolution structural insights into ligand binding and immune cell recognition by human lung surfactant protein D. *D J Mol Biol*, 331: 509-523, 2003.
- Silander K, Mohlke KL, Scott LJ, Peck EC, Hollstein P, Skol AD, Jackson AU. et al.: Genetic variation near the hepatocyte nuclear factor-4 alpha gene predicts susceptibility to type 2 diabetes. *Diabetes*, 53: 1141-1149, 2004.

- Singh M, Madan T, Waters P, Parida SK, Sarma PU, Kishore U: Protective effects of a recombinant fragment of human surfactant protein D i a murine model of pulmonary hypersensitivity induced by dust mite allergens. *Immunol Lett*, 86: 299-307, 2003.
- Singh P, Jia H, Wiles K, Hesselberth J, Liu L, Conway B i col.: Production of  $\beta$ -defensins, by human airway epithelia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 14961-14966, 1998.
- Sivitz WI, Walsh SA, Morgan DA, Thomas MJ, Haynes WG: Effects of leptin on insulin sensitivity in normal rats. *Endocrinology*, 138: 3395-3401, 1997.
- Smith U, Hammersten J, Björntorp P, Kral J: Regional difference and effect of weight reduction on human fat cell metabolism. *Eur J Clin Invest*, 9: 327-333, 1979.
- Snyder JM, Kwun JE, O'Brien JA, Rosenfeld CR, Odom MJ: The concentration of the 35-kDa surfactant apoprotein in amniotic fluid from normal and diabetic pregnancies. *Pediatr Res*, 24: 728-734, 1988.
- Snyder JM i Mendelson CR: Insulin inhibits the accumulation of the major lung surfactant apoprotein in human fetal lung explants maintained *in vitro*. *Endocrinology*, 120: 1250-1257, 1987.
- Soler J, Raurell M, Nacher V: Diabetis Mellitus (Síntesi i secreció d'insulina). *El Mèdul, Editors*. Barcelona: Associació Catalana de Diabetis, 4: 57-68, 1996.
- Song M i Phelps DS: Interaction of surfactant protein A with lipopolysaccharide and regulation of inflammatory cytokines in the THP-1 monocytic cell line. *Infect Immunol*, 68(12): 6611-6617, 2000.
- Sookoian SC, González C, Pirola CJ: Meta-analysis on the G-308A tumor necrosis factor  $\alpha$  gene variant and phenotypes associated with the metabolic syndrome. *Obesity Research*, 13: 2122-2131, 2005.
- Sørensen GL, Hjelmborg JvB, Kyvik KO, Fenger M, Høj A, Bendizen C, Sørensen TIA, Holmskov U: Genetic and environmental influences of surfactant protein D serum levels. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 209: 1010-1017, 2005.
- Sørensen GL, Hjelmborg JvB, Leth-Larsen R i col.: Surfactant protein D of the innate immune defense is inversely associated with human obesity and SP-D deficiency infers increased body weight in mice. *Scand J Immunol*, 64: 633-638, 2006.
- Sorensen GL, Husby S, Homskov U: Surfactant protein A and surfactant protein D variation in pulmonary disease. *Immunobiology*, 212: 381-416, 2007.
- Sorensen GL, Madsen J, Kejlting K, Tornoe I, Nielsen O, Townsend P, Poulain F, Nielsen CH, Reid KB, Hawgood S; Falk E, Holmskov U: Surfactant protein D is proatherogenic in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 290: H2286-H2294, 2006.
- Soukas A, Cohen P, Socci ND, Friedman JM: Leptin-specific patterns of gene expression in white adipose tissue. *Genes Dev*, 14: 963-980, 2000.
- Sparks JD i Sparks CE: Insulin modulation of hepatic synthesis and secretion of apolipoprotein B by rat hepatocytes. *J Biol Chem*, 265: 8854-8862, 1990.
- Spiegelman BM i Flier JS: Obesity and the regulation of energy balance. *Cell*, 104: 531-543, 2001.

- Spranger J, Kroke A, Mohlig M, Hoffmann K, Bergmann MM, Ristow M, Boeing H, Pfeiffer AF: Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Postdam Study. *Diabetes*, 52: 812-817, 2003.
- Stahlman MT, Gray ME, Whitsett JA: Temporal-spatial distribution of hepatocyte nuclear factor-3 $\beta$  in developing human lung and other foregut derivatives. *J Histochem Cytochem*, 46(8): 955-962, 1998.
- Stahlman MT, Gray ME, Hull WM, Whitsett JA: Immunolocalization of lung surfactant protein D (SP-A) in human fetal, newborn and adult tissues. *J Histochem Cytochem*, 50: 651-660, 2002.
- Stamme C, Walsh E, Wright JR: Surfactant protein A differentially regulates IFN- $\gamma$  and LPS-induced nitrite production by rat alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 23: 772-779, 2000.
- Starner TD, Agerberth B, Gudmundsson GH, McCray PB Jr: Expression and activity of beta-defensins and LL-37 in the developing human lung. *J Immunol*, 3: 1608-1615, 2005.
- Steel DM i Whitehead AS: The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. *Immunol Today*, 15: 81-87, 1994.
- Steiner KE, Williams PE, Lacy WW, Cherrington AD: Effects of insulin on glucagon-stimulated glucose production in the conscious dog. *Metabolism*, 49: 39-46, 2000.
- Stephens JM i Vidal-Puig AJ: An update on visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor, an ubiquitously expressed, illusive cytokine that is regulated in obesity. *Curr Opin Lipidol*, 17: 128-131, 2006.
- Stepan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, Lazar MA: The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*, 409: 307-312, 2001b.
- Stepan CM, Brown EJ, Wright CM i col.: A family of tissue-specific resistin-like molecules. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 502-506, 2001a.
- Stern M.P: The Insulin Resistance Syndrome. *International Textbook of Diabetes Mellitus*, second edition, 255-283, 1997.
- Strober W: Unraveling gut inflammation. *Science*, 313: 1052-1054, 2006.
- Strong P, Reid KBM, Clark H: Intranasal delivery of a truncated recombinant human SP-D is effective at down-regulating allergic hypersensitivity in mice sensitized to allergens of *Aspergillus fumigatus*. *Clin Exp Immunol*, 130: 19-24, 2002.
- Sugahara K, Imaya K, Sano K, Morioka T: Overexpression of pulmonary surfactant apoprotein A mRNA in alveolar type II cells and nonciliated bronchiolar (Clara) epithelial cells in streptozotocin-induced diabetic rats demonstrated by in situ hybridization. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 6: 307-314, 1992.
- Sugahara K, Iyama K, Sano K, Morioka T: Differential expressions of surfactant protein SP-A, SP-B, and SP-C mRNAs in rats with streptozotocin-induced diabetes demonstrated by in situ hybridization. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 11: 397-404, 1994.

- Sun L, Finnegan CM, Kish-Catalone T, Blumenthal R, Garzino-Demo P, La Terra Maggiore GM, Berrone S, Kleinman C, Wu Z, Abdelwahab S, Lu W, Garzino-Demo A: Human  $\beta$ -defensins suppress human immunodeficiency virus infection: potential role in mucosal protection. *J Virol*, 79: 14318-14329, 2005.
- Sun XJ, Miralpeix M, Myers MGJ, Glashee EM, Backer JM, et al.: The expression and function of IRS-1 in insulin signal transmission. *J Biol Chem*, 267: 22662-22672, 1992.
- Sun XJ, Rothenberg P, Khan CR, Backer JM, Araki E: The structure of the insulin receptor substrates IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature*, 352: 73-77, 1991.
- Svinarich DM, Gomez R, Romero R: Detection of human defensins in the placenta. *Am J Reprod Immunol*, 38: 252-255, 1997.
- Syvanne M i Taskinen MR: Lipids and lipoproteins as coronary risk factors in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet*, 350: I20-23, 1997.
- Taddei S, Ghiadoni L, Salvetti G, Virdis A, Salvetti A: Obesity and endothelial dysfunction. *G Ital Cardiol (Rome)*, 7: 715-723, 2006.
- Takahashi H, Fujisihima T, Koba H, Murakami S, Kurokawa K, Shibuya Y, Shiratori M, Kuroki Y, Abe S: Serum surfactant proteins A and D as pronostic factors in idiopathic pulmonary fibrosis and their relationship to disease extent. *Am J Respir Crit Care Med*, 162: 1109-1114, 2000.
- Takahashi H, Shiratori M, Kanai A, Chiba H, Kuroki Y, Abe S: Monitoring markers of disease activity for interstitial lung diseases with serum surfactant proteins A and D. *Respirology*, 11: S51-S54, 2006.
- Takeuchi T, Misaki A, Fujita J, Sonobe H, Ohtsuki Y: T-cadherin (CDH13, H-cadherin) expression downregulated surfactant protein D in bronchioloalveolar cells. *Virchows Arch*, 438: 370-375, 2001.
- Tang Y-Q, Vaun J, Osapay C, Tran D, Miller CA: A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated  $\alpha$ -defensins. *Science*, 286: 498-502, 1999.
- Tani K, Murphy WJ, Chertov O, Salcedo R, Koh CY, Utsonomiya I i col.: Defensins act as potent adjuvants that promote cellular an humoral immune responses in mice to a lymphoma idiotype and carrier antigens. *Int Immunol*, 12: 691-700, 2002.
- Taniuchi K, Chifu K, Hayashi N, Nakamachi Y, Miyamoto Y, Doi K, Baba S, Uchida Y, Tsukada Y, Sugimomi T: A new enzymatic method for the determination of sialic acid and its application as a marker of acute phase reactants. *Kobe J Med Sci*, 27: 91-102, 1981.
- Taylor SI, Barr V, Reitman M: Does leptin contribute to diabetes caused by obesity? *Science*, 274: 1151-1152, 1996.
- Territo MC, Ganz T, Selsted ME, Lehrer R: Monocytechemotactic activity of defensins from human neutrophils. *J Clin Invest*, 84: 2017-2020, 1989.
- Theiss WC, RuppGM, Varandani PT: Insulin-degrading activity in mononuclear and polymorphonuclear circulating leukocytes of nondiabetic and diabetic subjects. *J Clin Endocrinol Metab*, 59: 344-349, 1984.

- Thorand B, Lowel H, Schneider A, Kolb H, Meisinger C, Frohlich M, Koenig W: C-reactive protein as a predictor for incident diabetes mellitus among middle-aged men: results from the MONICA Augburg cohort study, 1984-1998. *Arch Intern Med*, 163: 93-99, 2003.
- Tino MJ i Wright JR: Interactions of surfactant protein A with epithelial cells and phagocytes. *Biochim Biophys*, 1408: 241-263, 1998.
- Tino MJ i Wright JR: Glycoprotein-340 binds surfactant protein-A (SP-A) and stimulates alveolar macrophage migration in an SP-A-independent manner. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 20: 759-768, 1999.
- Tokunaga A, Miura A, Okauchi Y, Segawa K, Fukuhara A, Okita K, Takahashi M, Funahashi T, Miyagawa J-I, Shimomura I, Yamagata K: The -1535 promoter variant of the visfatin gene is associated with serum triglyceride and HDL-cholesterol levels in japanese subjects. *Endocrine Journal*, 55: 205-212, 2008.
- Tremblay AJ, Morrissette H, Gagne JM, Bergeron J, Gagne C, Couture P: Validation of the Friedewald formula for the determination of low-density lipoprotein cholesterol compared with beta-quantification in a large population. *Clin Biochem*, 37: 785-790, 2004.
- Tusié Luna MT: Genes and Type 2 Diabetes Mellitus. *Archives of Medical Research*, 36: 210-222, 2005.
- Unger RH: The liporegulator system and disease. *Journ Annu Diabetol Hotel Diev*, 129: 43, 2001.
- Utzschneider KM i Kahn SE:  $\beta$ -Cell Dysfunction in Type 2 Diabetes. *International Textbook of Diabetes Mellitus*, Third Edition. Edited by DeFronzo RA, Ferrannini E, Keen H, and Zimmet P, 375-388, 2004.
- 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.
- Vague J: La differentiation sexuelle. Facteur determinant des formes de l'obésité. *Presse Med*, 55: 339, 1947.
- Valdes S, Botas P, Delgado E, Diaz Cadorniga F, Alvarez F: Population-based incidence of type 2 diabetes in northern Spain. The Asturias Study. *Diabetes Care*, 30(9): 2258-2263, 2007.
- Valenti L, Fracanzani AL, Dongiovanni P, Santorelli G, Branchi A, Taioli E, Fiorelli G, Fargion S: Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphisms and insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*, 122: 274-280, 2002.
- Valore EV, Park CH, Quayle AJ, Wiles KR, MCCray PB Jr, Ganz T: Human beta-defensin-1: an antimicrobial peptide of urogenital tissues. *J Clin Invest*, 101: 1633-1642, 1998.
- Van der Veer E, Nong Z, O'Neil C, Urquhart B, Freeman D, Pickering J.G: Pre-B-Cell Colony-Enhancing Factor Regulates NAD<sup>+</sup>-Dependent Protein Deacetylase Activity and Promotes Vascular Smooth Muscle Cell Maturation. *Mol Medic*, 2005.
- Van de Wetering JK, van Eijk M, van Golde LM, Hartung T, van Strijp JA, Batenburg JJ: Characteristics of surfactant protein A and D binding to lipoteichoic acid and peptidoglycan, 2 major cell wall components of gram-positive bacteria. *J Infect Dis*, 184: 1143-1151, 2001.

- Vandivier RW, Ogden CA, Fadok VA, Hoffman PR, Brown KK, Botto M, Walport MJ, Fisher JH, Henson PM, Greene KE: Role of surfactant proteins A, D and C1q in the clearance of apoptotic cells in vivo and in vitro: calreticulin and CD91 as a common collectin receptor complex. *J Immunol*, 169: 3978-3986, 2002.
- Van Iwaarden JF, van Strijp JA, Visser H, Haagsman HP, Verhoef J, van Golde LM: Binding of surfactant protein A (SP-A) to herpes simplex virus type 1-infected cells is mediated by the carbohydrate moiety of SP-A. *J Biol Chem*, 267: 25039-25043, 1992.
- Van Rozendaal BA, van Golde LM, Haagsman HP: Localization and functions of SP-A and SP-D at mucosal surfaces. *Pediatr Pathol Mol Med*, 20: 319-339, 2001.
- Van Rozendaal BAWM, van Spruel AB, van de Winkel JGJ, Haagsman HP: Role of pulmonary surfactant protein D in innate defense against *Candida albicans*. *J Infect Dis*, 182: 917-922, 2000.
- Vara E, Arias-Diaz J, Garcia C, Balibrea JL, Blazquez E: Glucagon-like peptide-1 (7-36) amide stimulates surfactant secretion in human type II pneumocytes. *Am J Respir Crit Care Med*, 163: 840-846, 2001.
- Veldhuizen RAW, Ito Y, Marcou J, Yao L-J, McCaig L, Lewis JF: Effects of lung injury on pulmonary surfactant aggregate conversion in vivo and in vitro. *Am J Physiol*, 272: L872-L878, 1997.
- Vidal-Puig A i Bjorbaek C: Genética molecular de la diabetes mellitus no insulinodependiente. *Med Clin*, 109: 107-114, 1997.
- Voorhout WF, Veenendaal T, Kuroki Y, Ogazawara Y, van Golde LM, Geuze HJ: Immunocytochemical localization of surfactant protein D (SP-D) i type II cells, Clara cells and alveolar macrophages of rat lung. *J Histochem Cytochem*, 40: 1589-1597, 1992.
- Vuorinen-Markkola H i Yki-Järvinen H: Hyperuricemia and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab*, 78: 25-28, 1994.
- Wajchenberg BL: Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocrine Reviews*, 21: 697-738, 2000.
- Walston J, Silver K, Bogardus C, Knowler WC, Celi FS, Austin S, Manning B, Strosberg AD, Stern MP, Raben N, Sorkin JD, Roth J, Shuldiner AR: Time of onset of non-insulin-dependent diabetismellitus and genetic variation in the  $\beta_3$ -adrenergic-receptor gene. *N Engl J Med*, 333: 343-347, 1995.
- Wang G, Bates-Kennedy SR, Tao JQ, Phelps DS, Floros J: Differences in biochemical properties and in biological function between human SP-A1 and SP-A2 variants, and the impact of ozone-induced oxidation. *Biochemistry*, 43: 4227-4239, 2004.
- Wang G, Guo X, Floros J: Human SP-A 3'-UTR variants mediate differential gene expression in basal levels and in response to dexamethasone. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 284: L738-L748, 2003.
- Wang G, Phelps DS, Umsead TM, Floros J: Human SP-A protein variants derived from one or both genes stimulate TNF-alpha production in the THP-1 cell line. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 278: L946-954, 2000.

- Wang G, Umstead TM, Phelps DS, AL-Mondhiry H, Floros J: The effect of ozone exposure on the ability of human surfactant protein a variants to stimulate cytokine production. *Environ Health Perspect*, 110: 79-84, 2002.
- Wang JY, Kishore U, Lim BL, Strong P, Reid KBM: Interaction of human lung surfactant proteins A and D with mite (*Dermatophagoides pteronyssinus*) allergens. *Clin Exp Immunol*, 106: 367-373, 1996.
- Wang JY, Shieh CC, You PF, Lei HY, Reid KBM: Inhibitory effect of pulmonary surfactant proteins A and D on allergen-induced lymphocyte proliferation and histamine release in children with asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 158: 510-518, 1998.
- Wang L, Brauner JW, Mao G, Crouch E, Seaton B, Head J, Smith K, Flach CR, Mendelsohn R: Interaction of recombinant surfactant protein D with lipopolysaccharide: conformation and orientation of bound protein by IRRAS and stimulation. *Biochemistry*, 47(31): 8103-8113, 2008.
- Wang T, Zhang X, Bheda P, Revollo JR, Imai S, Wolberger C: Structure of Nampt/PBEF/visfatin, a mammalian NAD<sup>+</sup> biosynthetic enzyme. *Nat Struct & Mol Biol*, 661-662, 2006.
- Wang W, Owen SM, Rudolph DL, Cole AM, Hong T, Waring AJ, Lal RB, Lehrer RI: Activity of  $\alpha$ - and  $\theta$ -defensins against primary isolates of HIV-1. *J Immunol*, 173: 515-520, 2004.
- Wannamethee SG, Shaper AG, Perry IJ, the British Regional Heart Study: Smoking as a modifiable risk factor for type 2 diabetes in middle-aged men. *Diabetes Care*, 24: 1590-1595, 2001.
- Watford WT, Wright JR, Garren Hester CG, Jiang H, Frank MM: Surfactant protein A regulates complement activation. *J Immunol*, 167(11): 6593-6600, 2001.
- Watts GF, Gwilym RM, Makurkiewicz J, Coltart J: Independent correlation between plasma lipoprotein(a) and angiographic coronary artery disease in NIDDM. *Diabetes Care*, 18: 234-236, 1995.
- Weaver TE i Whitsett JA: Function and regulation of expression of pulmonary surfactant-associated proteins. *Biochem J*, 273: 249-264, 1991.
- Weedon MN, Owen KR, Shields B, Hitman G, Walker M, McCarthy MI, Love-Gregory LD, Permutt MA, Hattersley AT, Frayling TM: Common variants of the hepatocyte nuclear factor-4 alpha P2 promoter are associated with type 2 diabetes in the UK population. *Diabetes*, 53: 3002-3006, 2004.
- Weikert LF, Edwards K, Chroneos ZC, Hager C, Hoffman L, Shepherd VL: SP-A enhances uptake of bacillus Calmette-Guerin by macrophages through a specific SP-A receptor. *Am J Physiol*, 272: L989-L995, 1997.
- Weinberg A, Krisanaprakornkit S, Dale BA: Epithelial antimicrobial peptides: review and significance for oral applications. *Crit Rev Oral Biol Med*, 9: 399-414, 1998.
- Weis WI, Taylor ME, Drickamer K: The C-type lectin superfamily in the immune system. *Immunol Rev*, 163: 19-34, 1998.

- Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr: Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*, 112: 1796-1808, 2003.
- Wellen KE i Hotamisligil GS: Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J Clin Invest*, 112(12): 1785-1788, 2003.
- Wellen KE i Hotamisligil GS: Inflammation, stress, and diabetes. Review of *J Clin Investig*, Vol 115, 5, 2005.
- Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE, Tataranni PA: Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab*, 86: 1930-1935, 2001.
- White MF: The insulin signaling system and the IRS proteins. *Diabetologia*, 40: 2-17, 1997.
- White MF: IRS proteins and the common path to diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 283(3): E413-E422, 2002.
- White RT, Damm D, Miller J, Spratt K, Schilling J, Hawgd S, Benson B, Cordell B: Isolation and characterization of the human pulmonary surfactant apoprotein gene. *Nature*, 317: 361-363, 1985.
- Whitsett JA: Surfactant proteins in innate host defense of the lung. *Biol Neonate*, 88: 175-180, 2005.
- Whitsett JA, Clark JC, Wispe JR, Pryhuber GA: Effects of TNF- $\alpha$  and phorbol ester on human surfactant protein and MnSOD gene transcription. *Am J Physiol*, 262: L688-L693, 1992.
- Whitsett JA, Pilot T, Clark JC, Weaver TE: Induction of surfactant protein in fetal lung. Effects of cAMP and desamethasone on SAP-35 RNA and synthesis. *J Biol Chem*, 262: 5256-5261, 1987.
- Whitsett JA, Weaver TE, Lieberman MA, Clark JC, Daugherty C: Differential effects of epidermal growth factor and transforming growth factor-beta on synthesis of Mr=35,000 surfactant-associated protein in fetal lung. *J Biol Chem*, 262: 7908-7913, 1987.
- Widen E, Lehto M, Kanninen T, Walston J, Shuldiner AR, Groop LC: Association of a polymorphism in the beta 3-adrenergic-receptor gene with features of the insulin resistance syndrome in Finns. *N Engl J Med*, 333: 348-351, 1995.
- Wilson CL, Oullette AJ, Satchel DP, Ayabe T, Lopez-Boado YS, Stratman JL: Regulation of intestinal  $\alpha$ -defensins activation by the metalloproteinase matrylsin in innate host defense. *Science*, 286: 113-117, 1999.
- Wolford JK, Hanson RL, Bogardus C, Prochazka M: Analysis of the lamin A/C gene as a candidate for type II diabetes susceptibility in Pima Indians. *Diabetologia*, 44: 779-782, 2001.
- Woods SC, Seeley RJ, Baskin DG, Schwartz MW: Insulin and the blood-brain barrier. *Curr Pharm Des*, 9: 795-800, 2003.
- Wright JR: Immunoregulatory functions of surfactant proteins. *Nat Rev Immunol*, 5: 58-68, 2005.

- Wright JR i Dobbs LG: Regulation of pulmonary surfactant secretion and clearance. *Annu Rev Physiol*, 53: 395-414, 1991.
- Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC: CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*, 249: 1431, 1990.
- Wu H, Kuzmenko A, Wan S, Schaffer L, Weixx A, Fisher JH, Kim KS, McCormack FX: Surfactant proteins A and D inhibit the growth of Gram-negative bacteria by increasing membrane permeability. *J Clin Invest*, 111: 1589-1602, 2003.
- Wu Z, Hoover DM, Yang D, Boulègue C, Santamaria F, Oppenheim JJ, Lubkowski J, Lu W: Engineering disulfide bridges to dissect antimicrobial and chemotactic activities of human  $\beta$ -defensin 3. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100: 8880-8885, 2003.
- Wu ZX i Lee LY: Airway responsiveness induced by chronic exposure to cigarette smoke in guinea pigs: role of tachykinins. *J Appl Physiol*, 87: 1621-1628, 1999.
- Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA, Chen H: Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest*, 112: 1821-1830, 2003.
- Yamada C, Sano H, Shimizu T, Mitsuzawa H, Nishitani C i col.: Surfactant protein A directly interacts with TLR-4 and MD-2 and regulates inflammatory cellular response. Importance of supratrimeric oligomerization. *J Biol Chem*, 28: 21771-21780, 2006.
- Yamaguchi Y, Nagase T, Makita R, Fukuhara S, Tomita T, Tominaga T, et al.: Identification of multiple novel epididymis-specific beta-defensin isoforms in the humans and mice. *J Immunol*, 169: 2516-2523, 2002.
- Yamanaka N, Kobayashi K, Kataura A, Kuroki Y, Akino T: Implication of surfactant apoprotein in otitis media with effusion. *Am Otol Rhinol Laryngol*, 100: 835-840, 1991.
- Yang CH, Szeliga J, Jordan J, Faske S, Sever-Chroneos Z, Dorsett B, Christian RE, Settlege RE, Shabanowitz J, Hunt DF, Whitsett JA, Chroneos ZC: Identification of the surfactant protein A receptor 210 as the unconventional myosin 18A. *J Biol Chem*, 280: 34447-34457, 2005.
- Yang D, Biragyn A, Hoover DM, Lubkowski J Oppenheim JJ: Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil-derived neurotoxin in host defense. *Annu Rev Immunol*, 22: 181-215, 2004.
- Yang Z, Jaekisch SM, Mitchell CG: Enhanced binding of *Aspergillus fumigatus* spores to A549 epithelial cells and extracellular matrix proteins by a component from the spore surface and inhibition by rat lung lavage fluid. *Thorax*, 55: 579-584, 2000.
- Ye HC, Punjabi NM, Wang NY, Pankow JS, Duncan BB, Brancati FL: Vital capacity as a predictor of incident type 2 diabetes: the Atherosclerosis Risk in Communities study. *Diabetes Care*, 28: 1472-1479, 2005.
- Ye SQ, Simon BA, Maloney JP, Zambelli-Weiner A, Gao L, Grant A, et al: Pre-B-cell colony-enhancing factor as a potential novel biomarker in acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*, 171: 361-370, 2005.

- Yi M, Tong GX, Murry B, Mendelson CR: Role of CBP/p300 and SRC-1 in transcriptional regulation of the pulmonary surfactant protein A (SP-A) gene by thyroid transcription factor-1 (TTF-1). *J Biol Chem*, 277: 2997-3005, 2002.
- Yin MJ, Yamamoto Y, Gaynor RB: The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I (kappa) B kinase-beta. *Nature*, 396: 77-80, 1998.
- Yki-Järvinen H: Role of insulin resistance in the pathogenesis of NIDDM. *Diabetologia*, 38: 1378-1388, 1995.
- Yki-Järvinen H: The Insulin Resistance Syndrome. *International Textbook of Diabetes Mellitus*, Third Edition. Edited by DeFronzo RA, Ferrannini E, Keen H, and Zimmet P, 359-373, 2004.
- Yki-Järvinen H: Glucose toxicity. *Endocr Rev*, 13: 415-431, 1992.
- Yki-Järvinen H i Koivisto VA: Effect of body composition on insulin sensitivity. *Diabetes*, 32: 965-969, 1983.
- Yong Lee S, Young Hur G, Hwan Jung k, Cheol Jung H, Yeub Lee S, Hyeong Kim J, Shin C, Jeong Shim J, Ho In K, Ho Kang K, Hwa Yoo S: PPAR- $\gamma$  agonist increase gefitinib's antitumor activity through PTEN expression. *Lung Cancer*, 51: 297-301, 2006.
- Young Kim K, Hee Ahn J, Gyeong Cheon H: Apoptotic action of PPAR- $\gamma$  action in human non-small cell lung cancer is mediated via proline oxidase-induced ROS formation. *Mol Pharmacol*, 2007.
- Yu C, Chen Y, Cline GW, Zhang D, Zong H, Wang Y, Bergeron R, Kim JK, Cushman SW, Cooney GJ, Atcheson B, White MF, Kraegen EW, Shulman GI: Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptors substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *J Biol Chem*, 277: 50230-50236, 2002.
- Yuan M, Konstantopoulos N, Lee J, Hansen L, Li ZW, Karin M, Shoelson SE: Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of ikkbeta. *Science*, 293: 1673-1677, 2001.
- Yudkin J: Coronary heart disease in diabetes mellitus three new risk factors and a unifying hypothesis. *J Intern Med*, 238: 21-30, 1995.
- Yudkin JS, Forrest RD, Jackson CA: Microalbuminuria as a predictor of vascular disease in non-diabetic subjects. Islington Diabetes Survey. *Lancet*, 2: 530-533, 1988.
- Yudin JS, Kumari M, Humphries SE, Mohamed-Ali V: Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link?. *Atherosclerosis*, 148: 209-214, 2000.
- Zachary T i Bloomgarden MD: Inflammation and Insulin Resistance. *Diabetes Care*, 5: 1619-1623, 2003.
- Zachary T i Bloomgarden MD: Inflammation and Insulin Resistance. *Diabetes Care*, 6: 1922-1926, 2003.
- Zalokar JB, Richard JL, Claude JR: Leukocyte count, smoking, and myocardial infarction. *N Engl J Med*, 304: 465-468, 1981.
- Zasloff M: Antimicrobial peptides of multicellular organism. *Nature*, 415: 389-395, 2002.

- Zavaroni I, Bonora E, Pagliara M, Dall'Aglio E, Luchetti L, Buonanno G. i col.: Risk factors for coronary artery disease in healthy persons with hyperinsulinemia and normal glucose tolerance. *New Engl J Med*, 320: 702-706, 1989.
- Zhang Y-Y, Gottardo L, Thompson R, Powers C, Nolan D, Duffy J, Marescotti MC, Avogaro A, Doria A: A visfatin promoter polymorphism is associated with low-grade inflammation and type 2 diabetes. *Obesity*, 14: 2119-2126, 2006.
- Zhao C, Wang I, Lehrer RI: Widespread expression of beta-defensin hBD-1 in human secretory glands and epithelial cells. *FEBS Lett*, 396: 319-322, 1996.
- Zhao XM, Wu YP, Wei R, Cai HX, Tornøe I, Han JJ, Wang Y, de Groot PG, Holmskov U, Xia ZL, Sørensen GL: Plasma surfactant protein D levels and the relation to body mass index in a chinese population. *Scand J Immunol*, 66: 71-76, 2007.
- Zhou L, Lim L, Costa RH, Whitsett JA: Thyroid transcription factor-1, hepatocyte nuclear factor-3 $\beta$ , surfactant protein B, C, and Clara cell secretory protein in developing mouse lung. *J Histochem Cytochem*, 44: 1183-1193, 1996.
- Ziccardi P, Nappo F, Giugliano G, Esposito K, Marfella R, Cioffi M, D'Andrea F: Reduction of inflammatory cytokine concentrations and improvement of endothelial functions in obese women after weight loss over one year. *Circulation*, 105: 804-809, 2002.
- Zimmermann GR, Legault P, Selsted ME, Pardi A: Solution structure of bovine neutrophil beta-defensin-2: the peptide fold of the beta-defensins is identical to that of the classical defensins. *Biochemistry*, 34: 13663-13671, 1995.
- Zimmerman PE, Voelker DR, McCormack FX, Pulsrud JR, Martin WJ: 120kD surface glycoprotein of *Pneumocystis carinii* is a ligand for surfactant protein A. *J Clin Invest*, 89: 143-149.



## **8. ANNEX**

## **ARTICLE 1**

J.M. Fernández-Real, B. Chico, S. Masanori... [et al.]. "Circulating Surfactant Protein A (SP-A), a marker of lung injury, is associated with insulin resistance". *Diabetes Care*. Vol. 31, number 5 (5 may 2008) : p. 958-963.

<http://dx.doi.org/10.2337/dc07-2173>

Department of Diabetes, Endocrinology and Nutrition, Institut d'Investigacio Biomédica de Girona and CIBER Fisiopatologia de la Obesidad y Nutricion, Girona, Spain

Received 20 november 2007. Accepted 11 february 2008

## **ABSTRACT**

Impaired lung function and inflammation have both attracted interest as potentially novel risk factors for glucose intolerance, insulin resistance, and type 2 diabetes. We hypothesized that circulating levels of surfactant protein (SP)-A, which reflects interstitial lung injury, could be associated with altered glucose tolerance and insulin resistance. Circulating SP-A concentration and metabolic variables (including insulin sensitivity by minimal model method,  $n = 89$ ) were measured in 164 nonsmoking men. Circulating SP-A concentration was significantly higher among patients with glucose intolerance and type 2 diabetes than in subjects with normal glucose tolerance, even after adjustment for BMI, age, and smoking status (ex/never). The most significant differences were found in overweight and obese subjects with altered glucose tolerance ( $n = 59$ ) who showed significantly increased serum SP-A concentrations (by a mean of 24%) compared with obese subjects with normal glucose tolerance ( $n = 58$ ) (log SP-A  $1.54 \pm 0.13$  vs.  $1.44 \pm 0.13$ ;  $P < 0.0001$ ). Insulin sensitivity ( $P = 0.003$ ) contributed independently to 22% of SP-A variance among all subjects. In subjects with altered glucose tolerance, insulin sensitivity ( $P = 0.01$ ) and fasting triglycerides ( $P = 0.02$ ) contributed to 37% of SP-A variance. Controlling for serum creatinine or C-reactive protein in these models did not significantly change the results. Lung-derived SP-A protein was associated with altered glucose tolerance and insulin resistance in 164 nonsmoking men.

## **ARTICLE 2**

A. López-Bermejo, B. Chico, A. Castro... [et al.]. "Alpha Defensins 1, 2, and 3 Potential Roles in Dyslipidemia and Vascular Dysfunction in Humans". *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 27 (2007) : p. 1166-1171.

<http://DX.DOI.ORG/10.1161/ATVBAHA.106.138594>

Diabetes, Endocrinology, and Nutrition Unit. Internal Medicine, Dr Josep Trueta Hospital, Girona; the Girona Institute for Biomedical Research, Girona; and the Endocrine Laboratory (R.C.), University Clinical Hospital, Barcelona, Spain.

Original received December 19, 2006; final version accepted February 1, 2007. Published online before print February 15, 2007

## **ABSTRACT**

$\alpha$ -Defensins are natural antibiotics made by neutrophils that have been reported to modulate cholesterol metabolism and vascular function; however, their role in vivo remains largely unknown. We hypothesized that  $\alpha$ -defensins 1 to 3 (DEFA1–3) are associated with serum lipids and vascular reactivity in humans.

**KEYWORDS:** human neutrophil peptide • defensin • cholesterol • insulin resistance • vascular function

### **ARTICLE 3**

A. López, B. Chico, M Fernández ... [et al.]. "Serum Visfatin Increases With Progressive  $\beta$ -Cell Deterioration". *Diabetes*. Vol. 55 (october 2006) : 2871-2875.

<http://dx.doi.org/10.2337/db06-0259>

Diabetes, Endocrinology and Nutrition Unit, Dr. Josep Trueta Hospital, Girona, Spain.

Girona Institute for Biomedical Research, Girona, Spain.

Received for publication February 23, 2006 and accepted in revised form July 19, 2006

### **ABSTRACT**

Visfatin has shown to be increased in type 2 diabetes but to be unrelated to insulin sensitivity. We hypothesized that visfatin is associated with insulin secretion in humans. To this aim, a cross-sectional study was conducted in 118 nondiabetic men and 64 (35 men and 29 women) type 2 diabetic patients. Type 1 diabetic patients with long-standing disease ( $n = 58$ ; 31 men and 27 women) were also studied. In nondiabetic subjects, circulating visfatin (enzyme immunoassay) was independently associated with insulin secretion (acute insulin response to glucose [AIRg] from intravenous glucose tolerance tests) but not with insulin sensitivity ( $S_i$ ) or other metabolic or anthropometric parameters, and AIRg alone explained 8% of visfatin variance ( $\beta = -0.29$ ,  $P = 0.001$ ). Circulating visfatin was increased in type 2 diabetes (mean 18 [95% CI 16–21] vs. 15 ng/ml [13–17] for type 2 diabetic and nondiabetic subjects, respectively;  $P = 0.017$ , adjusted for sex, age, and BMI), although this association was largely attenuated after accounting for HbA<sub>1c</sub> (A1C). Finally, circulating visfatin was found to be increased in patients with long-standing type 1 diabetes, even after adjusting for A1C values (37 ng/ml [34–40];  $P < 0.0001$ , adjusted for sex, age, BMI, and A1C compared with either type 2 diabetic or nondiabetic subjects). In summary, circulating visfatin is increased with progressive  $\beta$ -cell deterioration. The study of the regulation and role of visfatin in diabetes merits further consideration.

Visfatin (also known as pre-B-cell colony-enhancing factor) is a novel adipokine that is predominantly secreted by visceral adipose tissue, although controversy exists over the contribution of this fat depot to serum visfatin in humans. The protein exerts adipogenic effects in vitro and therefore is a good candidate to explain the accumulation of visceral adipose tissue that is associated with insulin resistance. Unexpectedly, insulin-mimetic effects were documented for this new adipokine, which are mediated by direct binding and activation of the insulin receptor.

