

**DEPARTAMENTO DE BIOLGÍA CELULAR,
FISIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA**



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

**Papel de la somatostatina, cortistatina y
ghrelina en la desregulación celular y molecular
del páncreas endocrino en situaciones
metabólicas normales y extremas
como la obesidad y la diabetes.**

**Belén Chanclón García
Córdoba 2013**

TITULO: *Papel de la somatostatina, cortistatina y ghrelina en la desregulación celular y molecular del páncreas endocrino en situaciones metabólicas normales y extremas como la obesidad y la diabetes*

AUTOR: *BELÉN CHANCLÓN GARCÍA*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba.
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es

**DEPARTAMENTO DE BIOLGÍA CELULAR,
FISIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA**



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

**Papel de la somatostatina, cortistatina y
ghrelina en la desregulación celular y molecular
del páncreas endocrino en situaciones
metabólicas normales y extremas
como la obesidad y la diabetes.**

Memoria de Tesis Doctoral presentada por **Belén Chanclón García**,
Licenciada en Biología, para optar al grado de **Doctor en Ciencias**.

Los Directores

Dr. Francisco Gracia Navarro
Catedrático de Biología Celular
de la Universidad de Córdoba

Dr. Antonio J. Martínez Fuentes
Profesor Titular de Biología Celular
de la Universidad de Córdoba

En Córdoba, a 14 de Enero de 2013.



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

DEPARTAMENTO DE BIOLGÍA
CELULAR, FISIOLÓGÍA E
INMUNOLOGÍA



GRUPO DE
ENDORINOLOGÍA
CELULAR Y MOLECULAR

D^o Francisco Gracia Navarro y D^o Antonio J. Martínez Fuentes,
Catedrático de Biología Celular y Profesor Titular del Departamento de
Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Universidad de Córdoba,

INFORMAN

Que D^o Belén Chanclón García, Licenciada en Biología, ha realizado bajo
nuestra dirección el trabajo titulado **“Papel de la somatostatina,
cortistatina y ghrelina en la desregulación celular y molecular del
páncreas endocrino en situaciones metabólicas normales y extremas
como la obesidad y la diabetes”** y que bajo nuestro juicio reúne los
méritos suficientes para optar al Grado de Doctor en Ciencias.

Y para que conste, firmo la presente en Córdoba, a 14 de Enero de 2013.

Fdo.: Dr. Francisco
Gracia Navarro

Fdo.: Dr. Antonio Jesús
Martínez Fuentes



TÍTULO DE LA TESIS: Papel de la somatostatina, cortistatina y ghrelina en la desregulación celular y molecular del páncreas endocrino en situaciones metabólicas normales y extremas como la obesidad y la diabetes.

DOCTORANDA: Belén Chanclón García.

INFORME RAZONADO DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

Dña. Belén Chanclón García presenta un trabajo original en el que se aborda el estudio de la implicación de los sistemas SST/CORT y ghrelina en la patofisiología del páncreas. El desarrollo de dicho estudio ha permitido avanzar en el conocimiento del importante papel que juegan los distintos componentes de estos sistemas en diferentes modelos metabólicos. Los resultados obtenidos permiten definir nuevas opciones y posibles dianas terapéuticas de gran interés en el tratamiento de la alteración pancreática en situaciones metabólicas extremas. Estos resultados están sometidos en revistas de reconocido prestigio internacional.

La tesis doctoral presentada se enmarca dentro de proyectos de investigación financiados por las ayudas BFU2007-60180/BFI, BFU2008-01136-BFI, BFU2010-19300 (Ministerio de Ciencia e Innovación/FEDER), CIBERobn (Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición, Instituto de Salud Carlos III), BIO-139, CTS-5051 (Junta de Andalucía).

Finalmente, cabe destacar la formación técnica y científica alcanzada por la doctoranda. El desarrollo de la tesis le ha permitido adquirir conocimientos teóricos y metodológicos que la habilitan para desarrollar nuevas hipótesis y participar activamente en la redacción y coordinación de nuevos artículos científicos y proyectos de investigación.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 14 de Enero de 2013.

Firma de los directores

Fdo.: Dr. Francisco Gracia Navarro

Fdo.: Dr. Antonio J. Martínez Fuentes

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Universidad de Córdoba, bajo la dirección de los Dres. Francisco Gracia Navarro y Antonio J. Martínez Fuentes. Dicho proyecto fue subvencionado mediante las ayudas BFU2007-60180/BFI, BFU2008-01136-BFI, BFU2010-19300 (Ministerio de Ciencia e Innovación/FEDER), CIBERobn (Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición, Instituto de Salud Carlos III), BIO-139, CTS-5051 (Junta de Andalucía).

Agradecimientos

Esta Tesis es el resultado de años de esfuerzo, sacrificios y obstáculos pero también de satisfacciones y muy buenos momentos. Hoy quiero agradecer a las personas que han participado durante este tiempo, de un modo u otro, en mi crecimiento profesional y personal.

En primer lugar, quisiera dedicarle mis primeras palabras a mis directores, Francisco Gracia y Antonio J. Martínez, por su apoyo, seguimiento y orientación. Paco, muchas gracias por aceptar dirigir esta Tesis y por la generosidad, rigor y elegancia aportada. Antonio, gracias por compartir tu valiosa experiencia y conocimientos, así como la paciencia y los buenos consejos que me has brindado estos años. Gracias a los dos, sin vosotros no hubiera sido posible.

A Justo P. Castaño, a quien admiro y a quien debo, en parte, mi entrada en este grupo de investigación. A María del Mar Malagón, por sus palabras siempre amables, su interés y la ayuda prestada desde el principio. A Raúl Luque, alguien de quien he aprendido mucho. Gracias por tu contribución en esta Tesis y tu ayuda. También quiero agradecerle a Rafa y a Soco los consejos y las palabras de apoyo que me han dedicado durante estos años.

A mis compañeros de laboratorio. En primer lugar quiero darle las gracias a Laura, por ser buena compañera, buena amiga y mejor persona... “ya no hay nada que me quite este sabor”. También quiero agradecer a Alicia los buenos momentos compartidos dentro y fuera del laboratorio. Gracias por escucharme. A José Alberto y Julia, por brindarme su amistad y demostrar con creces esa luz... bendito lado oscuro!. A Anabel, por su compañerismo y su sonrisa, así como al resto de mis compañeros de laboratorio: Yoana, Farid (mucho ánimo a los dos en vuestra última etapa), David, Dani, Elena, Lucía, Alejandro, Esther, Antonio, Alberto, Rocío (gracias por tu actitud y aptitud), Andrés, Laurita, Natalia, Husam y Encarni. También a Manuel por estar en mis comienzos, a Jose por lo que me enseñó. Además quiero dar las gracias a Manuela por su ilusión y a los que estuvieron, Mariquilla, Ester, Marina, Ana, David, Juanra, Mario, Mónica y Laura, por los buenos recuerdos. A todos ellos gracias por el entusiasmo y hacer de nuestro lugar de trabajo un espacio entretenido y distendido.

A Rosa y Mercedes por sus no pocas muestras de cariño, su buen humor y la ayuda que me han ofrecido siempre. A Amparo por todas las conversaciones y por facilitarme el odioso papeleo!

A Jose Manuel, Jose Antonio e Isabel por el tiempo dedicado en la preparación de prácticas, en el microscopio electrónico o sencillamente por el rato agradable mientras tomamos café.

No puedo olvidarme de mi grupo de Turín. A Riccarda Granata, grazie mille per il tuo meraviglioso trattamento durante quelli otto mesi a Torino. A Marta, Cri, Iacopo, Alessandra, Fabio, Davide e tutti collegi torinesi, mi mancate ancora! Grazie da tutto.

Anche non posso dimenticare a Linda e Rosalba, per farmi sentire a casa quando ero così lontana. Grazie mille.

A mis amigos, por intentar entender “aquello a lo que me dedico” y por ayudarme a desconectar y a disfrutar de las cosas “aparentemente” poco importantes. Laura tú has sido un pilar muy importante para mí durante estos años. Gracias por tu alegría en mis buenos momentos, tu preocupación en los difíciles y tu generosidad eterna.

A Mati y a Manolo, que me han tratado como a una hija más. No hay palabras para agradeceros tanto cariño. Gracias por los infinitos detalles, por vuestro optimismo y por haberme enseñado una nueva forma de ver las cosas. También a Marta y a Arturo, por más de lo mismo. Gracias.

A mis padres y a mi hermano, a quienes les debo todo. Han sido muchas horas de teléfono... apoyándome cuando más lo he necesitado y enseñándome una vez más que con esfuerzo y ganas, nada es imposible. Gracias por valorar mi trabajo, por apoyar siempre las decisiones que he tomado y por confiar en mí.

Por último, quiero darle las gracias a Manuel, la persona que sin duda ha compartido conmigo más intensamente las vivencias de esta Tesis. Gracias por caminar siempre a mi lado incluso a infinitos kilómetros de distancia, por animarme a seguir adelante y por quererme ... “tienes abrazos que abarcan ciudades”...

Resumen

Introducción.

El adecuado funcionamiento del eje neuroendocrino-metabólico es crucial para el mantenimiento de la homeostasis del organismo, de forma que los defectos de su regulación conducen con frecuencia a graves patologías, tales como la obesidad, anorexia o diabetes. En el complejo proceso de modulación de la homeostasis juega un papel esencial la regulación precisa de la secreción de neuropéptidos y hormonas, pues su disfunción puede provocar una liberación tanto excesiva como deficiente de estos factores que, a su vez, son la causa de desordenes endocrino-metabólicos. Así, la regulación de la homeostasis energética constituye en realidad un complejo proceso en el que están implicados diversos componentes tanto de origen central (hipotálamo), como hipofisario y periférico (tejido adiposo, estómago, hígado, páncreas, gónadas, etc) que, en conjunto, forman un circuito regulador integrado. Además, en los últimos años viene recibiendo una atención muy especial el sistema que regula la ingesta y las patologías asociadas, como la obesidad y anorexia, debido a que estas patologías están aumentando a tasas epidémicas en todo el mundo.

La somatostatina (SST), es un péptido de 14 aminoácidos inicialmente aislado del hipotálamo ovino por su capacidad para inhibir la secreción de la hormona del crecimiento. Inmediatamente tras su descubrimiento se encontró que la somatostatina estaba ampliamente distribuida en diferentes órganos y tejidos, especialmente en el páncreas y el tracto gastrointestinal, y que ejerce una gama de acciones y funciones patofisiológicas desde la inhibición de secreciones endocrinas hasta la neurotransmisión, pero también ejerce el control de la motilidad intestinal, la función pancreática, función inmune y crecimiento de las células tumorales. Esta capacidad pleiotrópica de la SST es debida a la amplia distribución en el organismo de una familia de 5 receptores específicos de somatostatina con 7 dominios transmembrana (TMDs), llamados sst1-sst5, que a veces están presentes simultáneamente e interaccionando funcionalmente en la misma célula. Sin embargo, la acción pleiotrópica de la somatostatina también se debe a la existencia de un péptido muy similar de la misma familia, la cortistatina (CORT), descubierta en 1996, que comparte 11 aminoácidos con la SST, posiblemente explicando así la comparable afinidad (nM) con la SST por los 5 sst. Aunque la CORT también fue inicialmente descubierta en el cerebro y es especialmente abundante en el córtex, estudios posteriores han demostrado que este neuropéptido está también ampliamente distribuido en el organismo y puede imitar la mayoría de las acciones endocrinas y no endocrinas de la SST. Realmente, las mayores divergencias entre SST y CORT residen en la capacidad de esta última para controlar la actividad locomotora y ejercer potentes acciones antiinflamatorias.

Por otro lado, la ghrelina, un péptido de 28 aminoácidos y acilado en su Ser-3, producido fundamentalmente en el estómago y presente también en el hipotálamo, fue descubierto por su

capacidad para estimular la liberación de GH a través del receptor para los secretagogos sintéticos de GH (GHS-R). De forma similar a la SST, e inmediatamente tras su descubrimiento, se demostró que la ghrelina estaba presente en multitud de órganos y tejidos, y ejerce diferentes acciones en condiciones normales y patológicas, desde la motilidad intestinal a la función pancreática, y de manera muy importante, en la regulación de la homeostasis metabólica, el apetito y la ingesta.

La regulación del eje neuroendocrino-metabólico es crucial para el correcto mantenimiento de la homeostasis del organismo, y sus defectos pueden producir graves patologías tales como obesidad, anorexia o la diabetes tipo 2. Dada la relevancia clínica y elevada prevalencia de estas patologías neuroendocrino-metabólicas, resulta esencial considerar su naturaleza multifactorial, analizando los diferentes sistemas de regulación implicados, y empleando modelos adecuados para obtener una perspectiva global, conjunta e integrada, que nos aproxime a su naturaleza real. En este contexto, la alteración del sistema regulador integrado por SST, CORT, ghrelina y sus receptores, pueden contribuir de manera relevante en la desregulación celular y molecular del páncreas endocrino en situaciones metabólicas normales y extremas como en la obesidad y el ayuno.

Objetivos.

El **objetivo general** de esta Tesis Doctoral es investigar el papel ejercido por los diferentes componentes del sistema SST/CORT/ghrelina y sus receptores (sst1-5, GHS-R1a) en condiciones metabólicas extremas como la obesidad y el ayuno. En particular, estableceremos el perfil de expresión básico, las funciones y la posible relevancia terapéutica de este sistema así como el de nuevos componentes del mismo identificados recientemente por nuestro equipo: los receptores truncados sst5 TMD1, TMD2 y TMD4, y la variante de ghrelina, In2 ghrelina.

Para ello, la presente Tesis Doctoral propone los siguientes **objetivos específicos**:

- 1.- Establecer y caracterizar el perfil o patrón de expresión básico a nivel pancreático del sistema SST/CORT/ghrelina y sus receptores (sst1-5, GHS-R,) en ratones normales y en ratones sometidos a condiciones relacionadas con alteraciones metabólicas (obesidad y ayuno).
- 2.- Determinar el papel de la SST y la CORT en alteraciones metabólicas como el ayuno y la obesidad inducida por la dieta en ratones carentes de la expresión de CORT.
- 3.- Evaluar funcional y molecularmente los componentes concretos del sistema regulador formado por SST, CORT, ghrelina y sus receptores, cuyos niveles se alteren sustancialmente en respuesta a estados metabólicos extremos (obesidad y ayuno). Para ello, emplearemos cultivos

de islotes pancreáticos procedentes de ratones normales y carentes de CORT en los que analizaremos su respuesta a condiciones a diferentes tratamientos farmacológicos.

Material y métodos.

Para alcanzar los objetivos propuestos, en primer lugar se estableció una colonia de animales C57Bl/6 con genotipo WT y CORT-KO partiendo de una pareja inicial, comprobando en todo momento el genotipo de las nuevas camadas mediante PCR convencional. Sobre este modelo se realizó un análisis morfológico mediante técnicas inmunohistoquímicas.

Con el fin de caracterizar funcionalmente el páncreas endocrino se analizó la expresión de CORT, SST, ghrelina y sus receptores (sst1-5, GHS-R1a) a nivel pancreático mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RT-PCRq). Para ello, se utilizaron ratones de la cepa C57Bl/6 en condiciones fisiológicas normales (alimentación normal; controles) con genotipo WT y CORT-KO.

Para estudiar el efecto de alteraciones metabólicas extremas (obesidad o ayuno) sobre la caracterización funcional del páncreas, los animales fueron sometidos a variaciones en su alimentación diaria mediante dieta. Además, este análisis se realizó en ambos genotipos para comparar el impacto que provoca la pérdida de CORT en el páncreas en estados fisiopatológicos. En la condición de obesidad (DIO), la dieta alta y baja en grasa (HFD y LFD) se suministró *ad libitum* a ratones jóvenes y adultos (durante 16, y 13 y 38 semanas respectivamente). Los distintos grupos experimentales se mantuvieron bajo observación desde el inicio de la dieta correspondiente hasta el momento del sacrificio. En el caso de los ratones sometidos a condiciones de ayuno, se suprimió el suministro de la dieta estándar durante las 24 y 48 horas anteriores al sacrificio, mientras que los animales control recibieron una alimentación diaria normal *ad libitum* en todo momento. En ambos diseños experimentales (obesidad y ayuno), el sacrificio de los animales se realizó por decapitación y el páncreas se procesó e inmediatamente congeló en nitrógeno líquido hasta el momento de medir la expresión génica mediante RT-PCRq.

Con el fin de estudiar a nivel de islotes pancreáticos el sistema regulador formado por SST, CORT, ghrelina y sus receptores, en primer lugar se procedió a aislar los islotes de Langerhans del resto del páncreas exocrino, usando técnicas de cultivo celular. En ellos se estudió la expresión génica de los sistemas objeto de estudio mediante RT-PCRq. Del mismo modo, también se estudió la respuesta a nivel de islotes pancreáticos (tanto de ratones normales como de carentes de CORT) a distintos tratamientos experimentales.

Resultados.

En primer lugar el estudio morfológico no reveló diferencias significativas a nivel pancreático entre los distintos genotipos estudiados (WT vs CORT-KO). Por otro lado, el análisis de los datos de expresión de los sistemas objeto de estudio en páncreas total e islotes pancreáticos confirmó que de los componentes del sistema SST, tan solo la SST y el sst2 se ven modificados por la ausencia de CORT. Por el contrario, se vio disminuida la expresión de algunos componentes del sistema ghrelina (GHS-R y GOAT) en ratones macho, mientras que la falta de CORT no alteró el nivel de otras hormonas como insulina y glucagón.

En el experimento de obesidad inducida por la dieta (DIO) durante la etapa adulta en ratones WT durante 13 semanas, la expresión de la mayor parte de los componentes del sistema SST permaneció invariable, excepto el receptor truncado TMD1 cuyo número de transcritos aumentó significativamente. En relación al sistema ghrelina se produjo un aumento en la expresión de GHS-R, y con respecto a otras hormonas pancreáticas de gran relevancia, observamos un aumento significativo de la expresión de insulina. Por otro lado, la DIO durante la etapa infantil (16 semanas) provocó un mayor número de cambios significativos en la expresión de varios componentes de estos sistemas a nivel pancreático. Así, además de modificarse el receptor truncado sst5 TMD1, curiosamente también se observó un aumento en la expresión del receptor sst2 en animales obesos, observando que la falta de CORT en el animal prevenía la sobreexpresión del sst2. Por su parte, los componentes del sistema ghrelina también aumentaron su expresión en el páncreas de ratones macho obesos. No obstante, en ausencia de CORT, todos los componentes estudiados del sistema ghrelina vieron reducida su expresión significativamente. Por último, del mismo modo a lo observado en los otros sistemas, el nivel de expresión de insulina se vio incrementado significativamente en animales WT obesos, aumento que no se produjo en ausencia de CORT endógena.

Bajo las distintas condiciones de ayuno se ha comprobado que el sistema SST ha visto reducido el número de transcritos de los genes SST (24 y 48 horas de ayuno) y sst2 (24 horas), principalmente en los ratones macho. Con respecto al sistema ghrelina, las condiciones de ayuno estudiadas mantuvieron invariables los niveles de expresión de ghrelina pancreática. Además, se observó una reducción en el número de transcritos de insulina en las hembras, pero no en los machos, y un aumento de expresión del glucagón transcurridas 24 o 48 horas de dicha condición.

A nivel de islotes pancreáticos, la falta de CORT en el animal ha modificado los componentes del sistema SST y del sistema ghrelina del mismo modo que lo observado a nivel de páncreas total, excepto en el caso de la enzima GOAT, que a nivel de islotes pancreáticos ha permanecido invariable. Por el contrario, el número de transcritos de insulina y glucagón a este nivel se ha

visto reducida como consecuencia de la ausencia total de CORT. Por último, el tratamiento con CORT-14 a los islotes pancreáticos en cultivo ha provocado una reducción significativa del nivel de ghrelina en el genotipo carente en CORT y un aumento en la expresión de insulina cuando se trató con CORT a los islotes procedentes de animales WT.

Conclusiones.

Estos resultados contribuyen a un mejor conocimiento del papel de estas hormonas en la función del páncreas y de su importancia en problemas fisiopatológicos de tanta relevancia como la obesidad o la diabetes. De este modo, las conclusiones de esta Tesis Doctoral son las siguientes:

1. La expresión constitutiva de SST y su receptor sst2 se ve alterada a nivel pancreático por la ausencia de CORT así como bajo determinadas situaciones metabólicas adversas (ayuno y obesidad).
2. La expresión pancreática del sistema ghrelina aumenta significativamente en condiciones de obesidad inducida por dieta a nivel pancreático.
3. La ausencia de CORT endógena previene la sobreexpresión de los componentes del sistema ghrelina a nivel pancreático.
4. La ausencia de CORT endógena previene o impide la elevada secreción de insulina (síntesis y liberación) que es característica de situaciones de obesidad, lo cual sugiere que la CORT endógena puede jugar un papel relevante en la función pancreática en situaciones normales y pato-fisiológicas.

Summary

Introduction.

The proper functioning of the neuroendocrine-metabolic axis is crucial for the maintenance of the homeostasis, thus defects on its regulation often lead to serious diseases, such as obesity, anorexia, or diabetes. In the complex homeostasis modulation process, precisely secretion of neuropeptides and hormones regulation play an essential role, since their dysfunction can cause both excessive and inadequate release of these factors which, in turn, are the cause of endocrine-metabolic disorders. Thus, the energy homeostasis regulation is actually a complex process in which various components of the central system (hypothalamus) pituitary and peripheral tissues (adipose tissue, stomach, liver, pancreas, gonads, etc) are implicated, and all together form part of an integrated regulator circuit. In addition, in recent years the system regulating food intake and associated diseases, like obesity and anorexia, comes receiving special attention since these diseases are increasing at epidemic rates worldwide.

Somatostatin (SST), is a 14 amino acid peptide originally isolated from sheep hypothalamus by its ability to inhibit the growth hormone secretion. Immediately after its discovery it was found that somatostatin was widely distributed in different organs and tissues, especially in the pancreas and the gastrointestinal tract, and that it exerts a range of actions and pathophysiologic functions, from inhibition of endocrine secretions to neurotransmission, but also carries out the control of intestinal motility, pancreatic function, immune function and growth of tumor cells. Such pleiotropic capacity of SST is due to the wide distribution in the organism of a family of 5 specific SST receptors with 7 transmembrane domains (TMDs), called sst1-sst5, which sometimes are present simultaneously and functionally interacting in the same cell. However, the pleiotropic action of SST is also due to the existence of a very similar peptide of its same family, cortistatin (CORT), discovered in 1996, which shares 11 amino acids with SST, thus explaining their comparable binding affinity (nM) with the 5 receptors of SST. Although CORT was also initially discovered at the brain and is especially abundant in the cortex, subsequent studies have shown that this neuropeptide is also widely distributed in the organism and can imitate most of endocrine and not endocrine SST actions. Effectively, the biggest divergence between SST and CORT reside in the latters capacity to control the locomotive activity and exert powerful anti-inflammatory actions.

On the other hand, ghrelin, a peptide 28 amino acids and acilated in its Ser-3, produced primarily in the stomach and present also in the hypothalamus, was discovered by its ability to stimulate the release of GH through the GH synthetic secretagogues receptor (GHS-R). Similarly to SST, and immediately after its discovery, it was showed that ghrelin was present in many organs and tissues, and exerts different actions under normal and pathological conditions from the intestinal motility to the pancreatic function, and very importantly, in the regulation of

metabolic homeostasis, appetite and food intake. Regulation of neuroendocrine-metabolic axis is crucial for the correct maintenance of the homeostasis in the organism, and its dysfunction can cause serious diseases such as obesity, anorexia, or type 2 diabetes. Given the clinical relevance and high prevalence of these neuroendocrine-metabolic pathologies, it is essential to consider its multifactorial nature, analyzing different regulatory systems involved, and using appropriate models to obtain a joint, integrated and global perspective which can approximate us to their real nature. In this context, alteration of the regulatory system formed by SST, CORT, ghrelin and its receptors can contribute in a relevant way in the molecular and cellular deregulation of the endocrine pancreas in metabolic normal and extreme situations such as obesity and fasting.

Objectives.

The **general objective** of this PhD Thesis is to investigate the role exerted by different components of SST/CORT/ghrelin systems and its receptors (sst1-5, GHS-R1a) in extreme metabolic conditions such as obesity and fasting. In particular, we will establish a basic expression profile, functions and the possible therapeutic relevance of these systems, as well as recently identified components by our team: the truncated receptors sst5 TMD1, TMD2 and TMD4, and the ghrelin variant, In2 ghrelin.

For this purpose, this PhD Thesis propose the following **specific objectives**:

- 1.- To establish and characterize the expression profile at the pancreatic level of components formed by SST/CORT and ghrelin systems in CORT-knockout mice (CORT-KO) and their respective control in normal conditions and in animals subjected to obesity and fasting conditions.
- 2.- To determine the role of SST and CORT at the pancreatic level in metabolic disturbances, as nutritional deficiency (fasting) and obesity induced in mice lacking expression of CORT.
- 3.- To evaluate molecularly and functionally components of the regulatory system comprising SST/CORT, ghrelin and its receptors in the modulation of the endocrine pancreatic function in islets from WT and CORT-KO mice in response to CORT treatments and under conditions of obesity.

Material and methods.

To achieve proposed objectives, it was established a WT and CORT-KO mice colony (C57Bl/6 mice), starting from an initial couple, ensuring at all times the new litters genotype by conventional PCR. Additionally, on this model was carried out a morphological analysis using immunohistochemical techniques.

In order to characterize the endocrine pancreas function, it was analyzed the expression of CORT, SST, ghrelin and its receptors (sst1-5, GHS-R1a) at the pancreatic level by using quantitative Real Time PCR (RT-PCRq). Thus, WT and CORT-KO mice were used in normal physiological conditions (normal feeding; controls).

To study extreme metabolic disorders effects (obesity, or fasting) on the functional characterization of the pancreas, animals were subjected to variations in their daily feeding through diet. In addition, this analysis was carried out in both genotypes to compare the impact of the absence of CORT in the pancreas under pathophysiological situations. In the condition of obesity (DIO), high and low fat diets (HFD and LFD) was supplied *ad libitum* to young and adult mice (during 16, and 13 and 38 weeks respectively). Experimental groups were kept under observation since the beginning of the corresponding diet until the time of sacrifice. In the case of mice submitted to fasting conditions, standard diet provision was deleted during 24 and 48 hours prior to sacrifice, while control animals received a normal daily diet *ad libitum* at all times. In both experimental designs (obesity and fasting), animal sacrifice was carried out by decapitation and pancreas was processed and immediately frozen in liquid nitrogen until the moment of the gene expression measure using RT-PCRq.

In order to study at the pancreatic islets level the regulatory system consisting of SST, CORT, ghrelin and their receptors, it was isolated islets of Langerhans from the rest of the exocrine pancreas, using cell culture techniques. Then, it was studied these systems gene expression by RT-PCRq. Similarly, we also studied the response at the pancreatic islets level (both normal and CORT-KO mice) to different experimental treatments.

Results.

Firstly the morphological study revealed no significant differences at the pancreatic level between WT vs CORT-KO genotypes. On the other hand, the analysis in total pancreas and pancreatic islets of these system expression confirmed that only SST and its receptor sst2 in the SST system were modified by the absence of CORT. By contrast, some ghrelin system components expression was decreased (GHS-R and GOAT) in male mice, while the lack of CORT in mice did not alter other hormones level expression, such as insulin and glucagon.

In the experiment of diet induced obesity (DIO) during the adult stage in WT mice for 13 weeks, the expression of most of components of SST system remained unchanged, except the truncated receptor sst5 TMD1 whose transcripts increased significantly. With reference to ghrelin system it was produced an increased of the GHS-R expression, and with respect to other relevance pancreatic hormones, we observed a significant increase in the expression of insulin. On the other hand, DIO during the childhood stage (for 16 weeks) resulted in a greater number

of significant expression changes of several components of these systems at the pancreatic level. Thus, beyond changes produced in the truncated receptor sst5 TMD1, interestingly also noted an increase of the sst2 expression in obese mice, noting that the lack of CORT in the animal prevented the sst2 over-expression. For its part, the ghrelin system components also increased its pancreatic expression of male obese mice. However, in the absence of CORT, all studied components of ghrelin system showed a significantly expression reduction. Finally, similarly to that is observed in other systems, the expression level of insulin was significantly rise in WT obese animals, increase that did not occur in the absence of endogenous CORT.

Under different fasting conditions it was found a reduction of the SST gene expression, under 24 and 48 hours of fasting, and the sst2 expression under 24 hours, mainly in male mice. With respect to the ghrelin system, fasting conditions studied kept unchanged the pancreatic ghrelin levels expression. In addition, it was observed an insulin transcripts diminution in females but not in males, and an increase in expression of glucagon within 24 or 48 hours of this condition.

At the pancreatic islets level, lack of CORT in the animal did not change SST and ghrelin system results observed in the total pancreas, except for the enzyme GOAT, which has remained unchanged in pancreatic islets. On the contrary, the number of transcripts of insulin and glucagon to this level has been reduced as a result of the total absence of CORT. Finally, pancreatic islets maintained in culture treated with CORT-14 showed a significant reduction in the ghrelin level in COR-KO mice, while the expression of insulin was increased when the WT islets were treated with CORT.

Conclusions.

These results contribute to a better understanding of these hormones roles in the pancreatic function and of its importance in relevance pathophysiological problems such as obesity or diabetes. In this way, the conclusions of this PhD Thesis are:

1. Pancreatic expression of SST system components is not altered by the absence of CORT or under conditions of obesity induced by a high fat diet, except the receptor sst2, which could be involved in the regulation of the CORT of pancreatic function.
2. Pancreatic expression of ghrelin system increases significantly in terms of diet induced obesity.
3. Absence of endogenous CORT prevents the pancreatic over-expression of ghrelin system components under obesity conditions.
4. Absence of endogenous CORT prevents the high secretion of insulin (synthesis and release) that is characteristic of obesity situations, suggesting that endogenous CORT may play a relevant role in pancreatic function in normal and pathophysiological situations.

Índice

Introducción.....	1
1. <u>Introducción</u>	3
1.1.El páncreas endocrino.....	6
2. <u>Sistema somatostatina/cortistatina</u>	6
2.1.Somatostatina y sus receptores.	6
2.2. Acciones biológicas de la SST.	8
2.3.Cortistatina y sus receptores.	11
2.4. Acciones biológicas de la cortistatina.	13
3. <u>Sistema ghrelina</u>	15
3.1. Componentes del sistema ghrelina.....	15
3.2. Acciones biológicas de la ghrelina.	17
4. <u>Sistema SST/CORT y ghrelina en el páncreas endocrino</u>	20
4.1. Sistema SST en el páncreas endocrino.....	20
4.2. CORT en el páncreas endocrino.	22
4.3. Sistema ghrelina en el páncreas endocrino.....	23
5. <u>Papel de SST/CORT y ghrelina en obesidad y diabetes</u>	26
5.1. Aspectos generales sobre obesidad y diabetes.....	26
5.2. Papel de SST y CORT en obesidad y diabetes.	28
5.3. Papel de la ghrelina en obesidad y diabetes.	30
5.4. Caracterización de los animales CORT-KO.....	32
Objetivos.....	35
Objectives.....	39
Material y métodos.....	43
1. <u>Animales de experimentación</u>	45
1.1. Gestión de la colonia.....	45
1.2. Genotipado.....	46
1.2.1. Genotipado de ratones CORT-KO.....	46
2. <u>Toma de muestra y diseño experimental</u>	48
2.1. Toma de muestras.....	50
2.1.1. Extracción del páncreas.....	50
2.2. Diseño experimental: dietas.....	50
2.2.1. Estudio de obesidad.....	50
2.2.2. Estudio de ayuno.....	52
2.3. Bombas de cortistatina.....	53
2.4. Aislamiento de islotes pancreáticos.....	53
2.5. Cultivo de islotes.....	55
2.5.1. Condiciones de cultivo.....	55

2.5.2.	Pureza de islotes.	55
2.5.3.	Tratamientos experimentales sobre islotes pancreáticos en cultivo.	55
3.	<u>Estudio morfológico del páncreas.</u>	56
3.1.	Inclusión en parafina.	56
3.2.	Tinción con hematoxilina-eosina.	56
3.3.	Inmunohistoquímica.	56
4.	<u>Técnicas de biología molecular.</u>	57
4.1.	Aislamiento de ARN.	57
4.1.1.	Aislamiento de ARN a través de columna.	57
4.2.	Retrotranscripción (RT).	58
4.3.	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).	58
4.3.1.	PCR convencional.	59
4.3.2.	Diseño de oligonucleótidos.	59
4.3.3.	Construcción de curvas estándar.	61
4.3.4.	PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR).	61
5.	<u>Análisis estadístico.</u>	62
6.	<u>Apéndices.</u>	63
6.1.	Apéndice 1: Listado de kits y reactivos utilizados.	63
6.2.	Apéndice 2: Preparación de medios para el aislamiento de islotes.	63
6.3.	Apéndice 3. Protocolo de inclusión en parafina.	64
6.4.	Apéndice 4. Protocolo de tinción con hematoxilina-eosina.	64
6.5.	Apéndice 5. Protocolo de inmunohistoquímica.	65
	Resultados.	67
1.	<u>Estudio morfológico del páncreas de ratones WT y CORT-KO</u>	69
1.1.	Tinción con hematoxilina-eosina.	69
1.2.	Inmunohistoquímica.	70
2.	<u>Perfil básico de expresión de los componentes de los sistemas SST/CORT y ghrelina en el páncreas de ratones WT y CORT-KO.</u>	71
2.1.	Sistema SST/CORT.	71
2.2.	Sistema ghrelina.	73
2.3.	Insulina y glucagón.	74
3.	<u>Modulación del perfil básico mediante la implantación de bombas de CORT en animales CORT-KO vs WT.</u>	76
3.1.	Sistema ghrelina.	76
3.2.	Insulina.	76

4. <u>Efecto de la obesidad (DIO) sobre la expresión de los componentes de los sistemas SST/CORT y ghrelina en el páncreas de ratones WT y CORT-KO.</u>	78
4.1. Animales WT adultos con dieta LFD y HFD durante 13 semanas.	78
4.1.1. Sistema SST/CORT.....	79
4.1.2. Sistema ghrelina.....	79
4.1.3. Insulina y glucagón.	80
4.2. Animales WT adultos con dietas LFD y HFD durante 38 semanas.....	81
4.2.1. Sistema SST/CORT.....	81
4.2.2. Sistema ghrelina.....	82
4.2.3. Insulina y glucagón.	82
4.3. Animales WT vs CORT-KO jóvenes con dietas LFD y HFD durante 16 semanas.	83
4.3.1. Sistema SST/CORT.....	83
4.3.2. Sistema ghrelina.....	86
4.3.3. Insulina y glucagón.	87
4.3.4. Estudio en islotes pancreáticos de animales WT y CORT-KO.....	89
4.3.5.1. Sistema SST/CORT.	89
4.3.5.2. Sistema ghrelina.....	89
4.3.5.3. Insulina y glucagón.	90
5. <u>Efecto del ayuno sobre la expresión de los componentes de los sistemas SST/CORT y ghrelina en el páncreas de ratones WT y CORT-KO.</u>	92
5.1. Animales CORT-KO vs WT.	92
5.1.1. Sistema SST/CORT.	93
5.1.2. Sistema ghrelina.....	94
5.1.3. Insulina y glucagón.	94
6. <u>Perfil básico de expresión de los componentes de los sistemas SST/CORT y ghrelina en el páncreas endocrino de ratones WT y CORT-KO.</u>	97
6.1. Sistema SST/CORT.	97
6.2. Sistema ghrelina.....	97
6.3. Insulina y glucagón.	98
7. <u>Modulación de la expresión de los componentes de los sistemas SST/CORT y ghrelina en cultivos de islotes pancreáticos de ratones WT y CORT-KO.</u>	99
7.1. Sistema SST/CORT.	99
7.2. Sistema ghrelina.....	100
7.3. Insulina y glucagón.	101
Discusión.	103
1. <u>Sistema SST/CORT a nivel pancreático.</u>	105
1.1. Modulación del sistema SST a nivel pancreático por DIO.	107
1.2. Modulación del sistema SST a nivel pancreático bajo condiciones	

de ayuno	109
2. <u>Sistema ghrelina a nivel pancreático.</u>	111
2.1. Modulación del sistema Ghrelina en obesidad	112
2.2. Modulación del sistema ghrelina en el páncreas en condiciones de ayuno	113
3. <u>Insulina y otras hormonas pancreáticas a nivel pancreático.</u>	115
3.1. Modulación de insulina y glucagón en el páncreas en DIO.	116
3.2. Modulación de insulina y glucagón en el páncreas en condiciones de ayuno.....	117
Conclusiones.	119
Conclusions	123
Bibliografía.	127

Introducción

1. Introducción

1.1. El páncreas endocrino.

El páncreas es un órgano mixto situado detrás del estómago, que se encuentra adherido al bazo y al intestino. La parte exocrina de dicho órgano está formada por células ductales y acinares que producen y vierten al duodeno una serie de hormonas que intervienen en la digestión. Su función endocrina se localiza en agrupaciones de células aisladas del tejido exocrino, denominados los islotes de Langerhans, los cuales constituyen del 1-5% del páncreas total en función de la especie.

A pesar de haberse descrito hasta 20 tipos celulares dentro de cada islote pancreático, principalmente se compone de 5 tipos de células secretoras de hormonas: las denominadas células alfa productoras de glucagón, las células beta productoras de insulina, las células delta productoras de SST, las células PP productoras del polipéptido pancreático o las ya establecidas células épsilon productoras de ghrelina (Fig.1) (Wierup *et al.*, 2002; Prado *et al.*, 2004; Cabrera *et al.*, 2006).

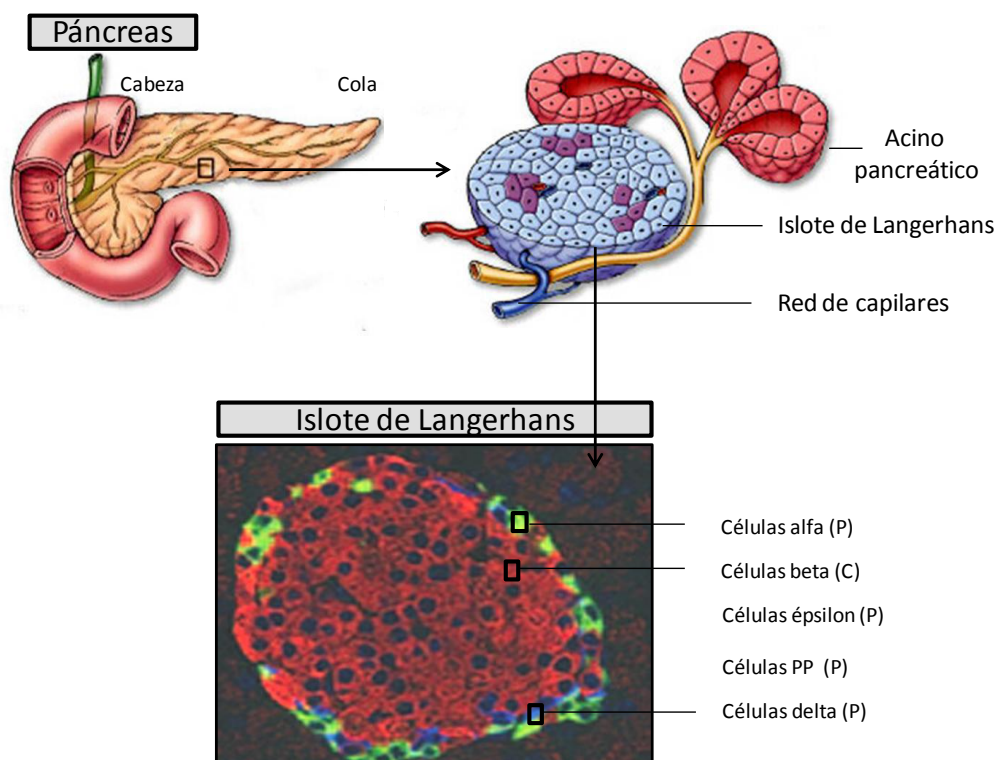


Fig. 1. Imagen del páncreas exocrino y endocrino, así como de los tipos celulares y su distribución en un islote pancreático de ratón (P:zona periférica; C: zona central). El color rojo representa las células beta, el verde las células alfa y el azul las células delta. Foto modificada de Cabrera et al., 2006, PNAS.

La forma y distribución celular dentro del islote pancreático también varía entre especies. De este modo, mientras en roedores el islote posee una morfología esférica donde las células beta se distribuyen en el núcleo, encontrándose en la periferia las células alfa, delta, PP y épsilon (Fig. 1), por el contrario, en humanos la forma es más irregular y la distribución celular es más heterogénea. En todos los casos, las células delta, PP y épsilon son las menos numerosas (Cabrera et al., 2006).

La proporción de los distintos tipos celulares dentro del islote también depende de la especie. En humanos, los islotes contienen menor proporción de células beta que en ratones, sin embargo poseen mayor número de células productoras de glucagón (Cabrera et al., 2006). Así, en humanos las células beta constituyen un 60% y las alfa un 30% del total, mientras que en el islote de ratón se ha descrito un 70% y un 20% de células beta y alfa respectivamente (Cabrera et al., 2006). Por otro lado, la distribución de los islotes depende de su localización a lo largo del páncreas, encontrando en la cabeza más densidad de islotes de pequeño tamaño, mientras que en la cola son menos numerosos pero de mayor tamaño (Cabrera et al., 2006).

Las interacciones existentes entre estos tipos celulares han sido ampliamente descritas por diversos autores, demostrando que se produce una regulación autocrina y paracrina dentro del islote (Lammert, 2009) (Fig. 2). De este modo, la insulina de la célula beta es capaz de inhibir la secreción de la célula alfa productora de glucagón mediante una regulación paracrina, además de estimular o inhibir su propia secreción. El glucagón por otro lado, puede activar la producción de insulina o de SST de las células beta o delta respectivamente. Además está bien establecido el papel inhibitorio de la SST sobre la célula beta y de la alfa, relación que se tratará en el apartado 4.1.

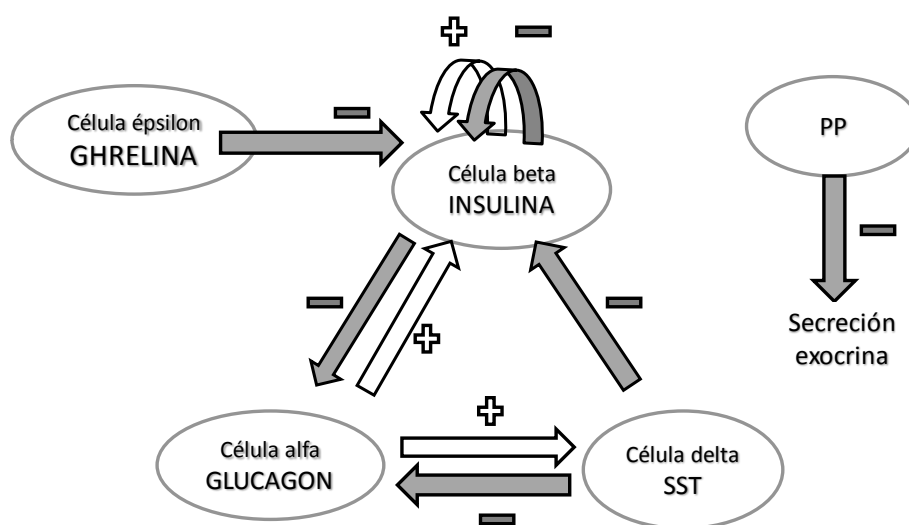


Fig.2. Representación esquemática de la interacción entre hormonas endocrinas en el islote pancreático.

La insulina es la principal hormona reguladora de la homeostasis del metabolismo, haciendo posible el abastecimiento de la glucosa necesaria a las células de distintos tejidos para sus necesidades energéticas. Su papel consiste en incorporar la entrada de glucosa en células de tejidos adyacentes como músculo, hígado y tejido adiposo favoreciendo rutas bioquímicas como glucólisis y la formación de glucógeno. De este modo, hace disminuir los niveles de glucosa circulantes y lo cual ayuda a mantener la homeostasis de la glucosa en el organismo (Fig.3).

El glucagón, es junto con la insulina, otra hormona responsable en el mantenimiento de los niveles adecuados de glucosa en plasma. Su papel consiste en aumentar los niveles de glucosa mediante la activación en el hígado de la glucogenolisis y así aumentar la producción de glucosa hepática (Fig.3).

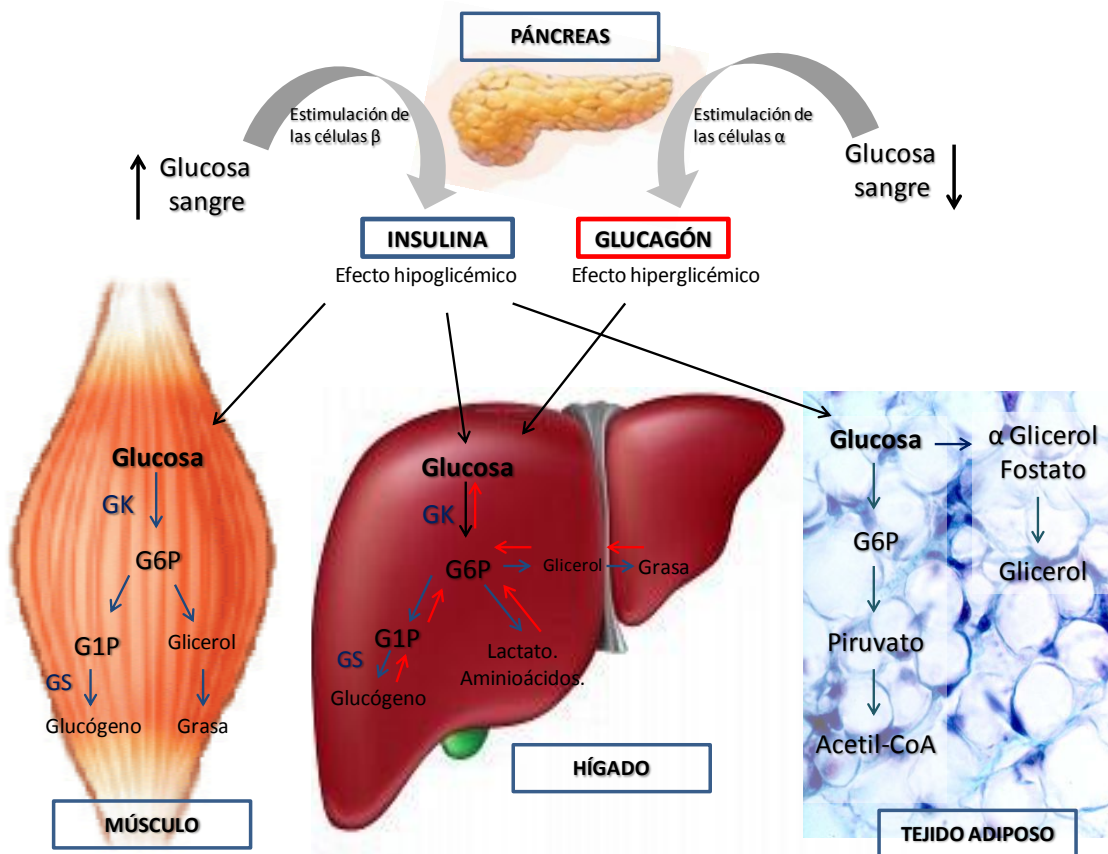


Fig. 3. Regulación bioquímica de la insulina y el glucagón sobre el metabolismo de la glucosa en el organismo.

El polipéptido pancreático (PP) realiza una función reguladora de la secreción exocrina. Con respecto a la SST y la ghrelina, por ser objeto de nuestro estudio se les dedicará un apartado detallado a continuación (Apartados 2 y 3).

2. Sistema Somatostatina/Cortistatina.

2.1. Somatostatina y sus receptores.

La Somatostatina (SST) se aisló inicialmente a partir del hipotálamo bovino como un péptido de 14 aminoácidos capaz de inhibir la producción de la hormona del crecimiento (GH) (Brazeau et al., 1973). Sin embargo, además de la SST-14, el precursor del gen de la SST (prepro-SST) también puede generar otra isoforma extendida en su extremo amino, formada por 28 aminoácidos (SST-28). Ambas isoformas comparten su secuencia, incluyendo la parte formada por los aminoácidos Phe-Trp-Lys-Thr, de crucial importancia para la unión a sus receptores y un puente disulfuro entre dos cisteínas responsable de su estructura cíclica (Pradayrol L *et al.*, 1980) (Fig.4).

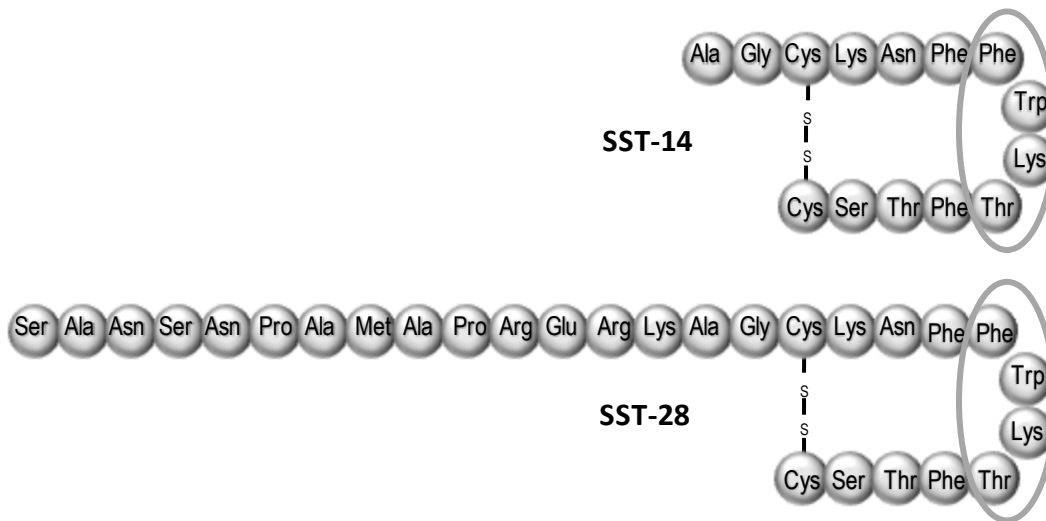


Fig.4. Esquema representativo de la secuencia aminoacídica de la SST-14.

Tanto la SST-14 como la SST-28 se encuentran ampliamente distribuidas por el organismo, sin embargo la presencia y abundancia de su expresión dependen del tejido. De esta forma, en el hipotálamo se produce hasta 4 veces más el péptido de 14 aminoácidos (Patel, 1999), mientras que en el intestino es mayoritaria la SST-28 (Patel, 1999), existiendo otros tejidos como estómago, retina o islotes pancreáticos donde sólo está presente la isoforma corta, SST-14. En conjunto, la SST se encuentra extensamente expresada a lo largo del sistema nervioso central (SNC) y en gran parte de los tejidos periféricos, ejerciendo funciones generalmente de carácter inhibitorio sobre la secreción endocrina y exocrina, neuromodulación, neurotransmisión,

motilidad gastrointestinal, sobre la función del sistema inmune o la función pancreática (Patel, 1999), que se detallarán en el Apartado 2.4.

Las acciones biológicas que desempeña la SST están mediadas por la asociación con los receptores de somatostatina (sst1-5), una familia de cinco receptores asociados a proteínas G, que están formados por 7 dominios transmembrana (7TMD) (Moller *et al.*, 2003; Gahete *et al.*, 2010a), como se representa en la Fig. 5A. La unión del ligando a estos receptores activa una serie de rutas de señalización intracelular, entre las que destaca la inhibición del AMP cíclico (AMPC) y la movilización de los canales de calcio, dos de los segundos mensajeros más involucrados en la liberación hormonal, así como en otras múltiples funciones (Patel, 1999). Estos receptores pueden estar presentes en el mismo tipo celular y tienen la capacidad de interactuar entre ellos, formando homo- o heterodímeros, activando de este modo distintas rutas de señalización (Durán-Prado *et al.*, 2009).

Además de los cinco receptores sst1-sst5, se ha descrito la existencia de variantes truncadas de algunos de ellos. Concretamente, se ha identificado una isoforma del receptor sst2, denominada sst2b, que al igual que la forma original del receptor (sst2a) tiene 7TMD. Sin embargo la secuencia del sst2b es más corta en su extremo carboxilo terminal, lo cual compete a la señalización de cascadas intracelulares (Vanetti *et al.*, 1992).

Por otro lado, también se han descubierto nuevas variantes del receptor sst5 con capacidad de unión a la SST y de generar respuestas celulares como la movilización de calcio o los niveles de AMPC. Se ha demostrado su presencia en distintas especies, así en humanos existen dos variantes del sst5 compuestos por 5 y 4 TMD (sst5TMD5 y sst5TMD4), mientras que en roedores se han descrito el sst5TMD4, sst5TMD2 y sst5TMD1 de 4, 2 y 1 TMD respectivamente (Fig. 5B, C y D). Estas nuevas isoformas están presentes en numerosos tejidos (Fig. 5), aunque hasta el momento se desconoce su papel a nivel fisiológico (Durán-Prado *et al.*, 2009; Córdoba-Chacón *et al.*, 2010). Sin embargo, cabe destacar que estudios recientes han demostrado que estas variantes truncadas se encuentran presentes en cierto tipo de tumores, relacionando su presencia con un mal pronóstico de la enfermedad (Durán-Prado *et al.*, 2009; Duran-Prado *et al.*, 2012).

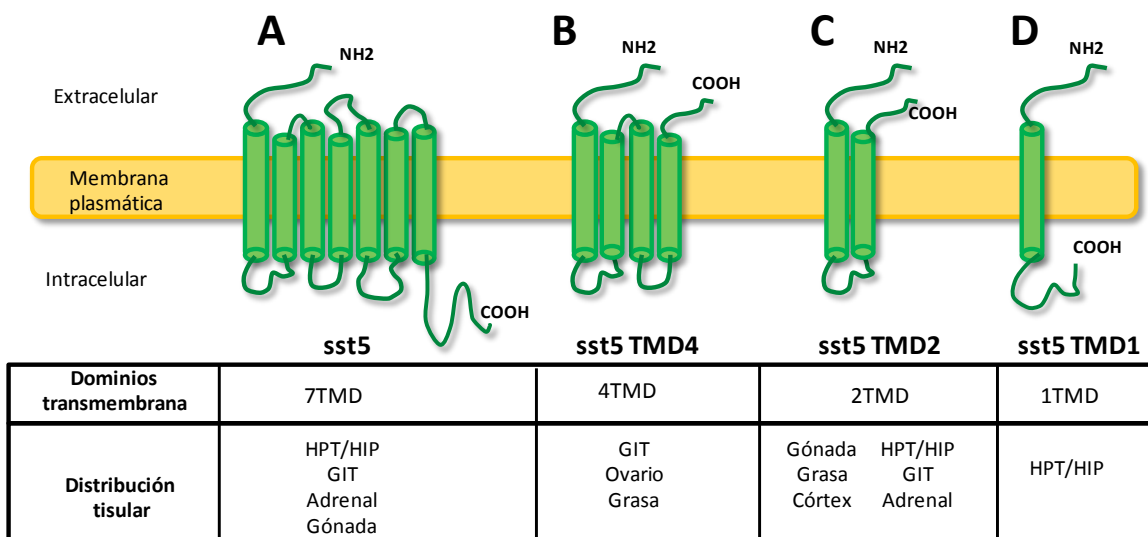


Fig. 5. Representación de los receptores sst5 de ratón truncados sst5TMD4, sst5TMD2 y sst5TMD1, indicando los tejidos donde se ha descrito su expresión (mRNA). (HPT: hipotálamo; HIP: hipófisis; GIT: tracto gastrointestinal). Modificado de Córdoba-Chacón et al., 2011.

2.2. Acciones biológicas de la Somatostatina.

A parte de en hipotálamo, la presencia de SST se ha descrito en diferentes zonas del SNC, así como en numerosos tejidos periféricos. La gran distribución tanto de la SST como de sus receptores sst1-sst5 justifica su amplio campo de acción, basado generalmente en el efecto inhibitorio que ejerce sobre numerosos tejidos diana, como se resume en la Fig. 6.

Conocida inicialmente por ser un represor de la liberación de la GH, actualmente se sabe que la SST además ejerce un papel modulador en la secreción endocrina de múltiples tejidos (Reichlin, 1983; Patel, 1999; Moller *et al.*, 2003; Gahete *et al.*, 2010a). Así, en el eje hipotálamo-hipofisario es capaz de actuar sobre la liberación de prolactina (PRL), corticotropina (ACTH) y tirotrina (TSH). Las funciones endocrinas de la SST también se extienden al tracto gastrointestinal inhibiendo la liberación de hormonas como la gastrina, secretina, colecistoquinina (CCK), ghrelina, motilina, péptido intestinal vasoactivo (VIP), péptido inhibidor gástrico (GIP), neurotensina o pepsina, (Patel, 1999; Moller *et al.*, 2003; Olias *et al.*, 2004). A nivel pancreático, la SST actúa como un potente inhibidor de la liberación de hormonas como la insulina, el glucagón o el polipéptido pancreático (PP), (Broglia *et al.*, 2002; Gahete *et al.*, 2008; Chanclón *et al.*, 2012), participando de este modo en la regulación de la homeostasis metabólica (Fig. 6).

No obstante, a pesar de su clásica función inhibidora sobre diferentes hormonas, recientemente ha observado que la liberación de GH es dependiente, ya no sólo de la dosis, sino además de la especificidad de unión a receptores (Córdoba-Chacón *et al.*, 2012a).

En cuanto a la acción que ejerce este péptido sobre glándulas exocrinas destaca su papel inhibidor sobre la glándula salivar, acinos pancreáticos o la mucosa intestinal, entre otros (Corleto, 2010).

Por otro lado, este péptido también posee la capacidad de regular procesos de neurotransmisión en el SNC, inhibiendo la liberación de dopamina o norepinefrina, causando así efectos sobre funciones sensoriales, locomotoras y cognitivas (Dournaud *et al.*, 1995; Patel, 1999; Gahete *et al.*, 2008; Luque *et al.*, 2008). De hecho, se ha demostrado que cambios en los niveles de SST y sus receptores a este nivel están relacionados con enfermedades neurodegenerativas, tales como el Alzheimer o el Parkinson (Ionov, 2008; Epelbaum *et al.*, 2009; Weiner *et al.*, 2012).

Más allá de su papel como neuromodulador y regulador de la función endocrina o exocrina, la SST puede retrasar el vaciado gástrico tardío, acelerar el vaciado gástrico temprano y aumentar el tiempo de tránsito por el intestino delgado (Moller *et al.*, 2003).

El sistema inmune también se encuentra regulado por la SST, controlando negativamente la respuesta secretora de basófilos, monocitos e inmunoglobulinas, y regulando la proliferación de linfocitos T y B, de un modo dosis-dependiente (Krantic *et al.*, 2004). Este tipo de regulación, también se ha observado en otros tejidos como el cardiovascular, donde la alta o baja concentración de SST provoca una respuesta positiva o negativa de la contracción ventricular de cardiomiocitos (Murray *et al.*, 2001).

Asimismo, este péptido está despertando un especial interés, ya no sólo por su papel en condiciones fisiológicas normales, sino también en relación con procesos de regulación tumoral o en enfermedades de gran incidencia en la población (Klaff LJ, 1987; Strowski & Blake, 2008; Tzotzas T, 2008). Debido a que la respuesta que genera es dependiente del tipo celular, del receptor y de la concentración a la que actúa, se hace visible el amplio abanico de posibilidades del papel que la SST puede desempeñar.

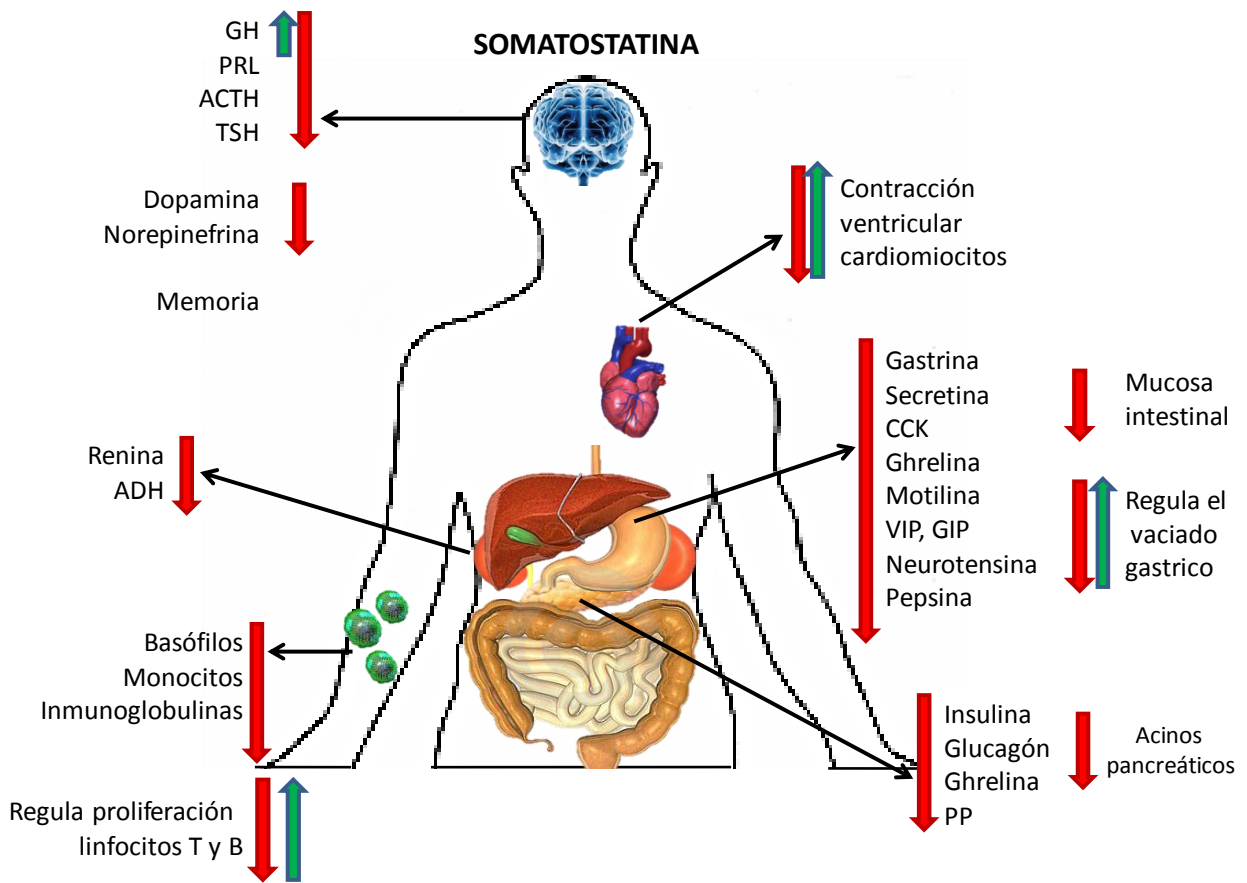


Fig. 6. Acciones biológicas de la SST.

2.3. Cortistatina y sus receptores.

Algo más de dos décadas después del aislamiento de la SST, se descubrió la Cortistatina (CORT), un neuropéptido de 14 aminoácidos que sorprendió por su semejanza estructural con la SST-14 (de Lecea et al., 1996; Tostivint et al., 2006). Tal similitud podría deberse a que pese a estar codificados por genes diferentes, ambos comparten un ancestro evolutivo común (Tostivint *et al.*, 2006 ; Gahete *et al.*, 2010a). Además, al igual que la SST, el precursor del gen de la CORT también puede generar varias isoformas biológicamente activas en las distintas especies donde ha sido identificado. La forma corta formada por 14 aminoácidos, CORT-14, es común en rata y ratón, existiendo un análogo de 17 aminoácidos en humanos (CORT-17). Otra isoforma más larga, la CORT-29, se observa en rata y humano, pero no en ratón. La semejanza estructural entre la CORT con la SST es evidente en ambas isoformas. De este modo, la CORT-14 comparte 11 de los 14 aminoácidos que forman su estructura con la SST-14 (Fig. 7), al igual que la CORT-29 también presenta una alta homología con la SST-28 (Spier & de Lecea, 2000). Incluso, sus isoformas comparten los cuatro aminoácidos que forman el conjunto denominado FWKT, imprescindible para la unión específica y activación de los receptores de SST y el enlace S-S que proporcionan la estabilidad necesaria para mantener la estructura cíclica de la molécula (Fig. 7).

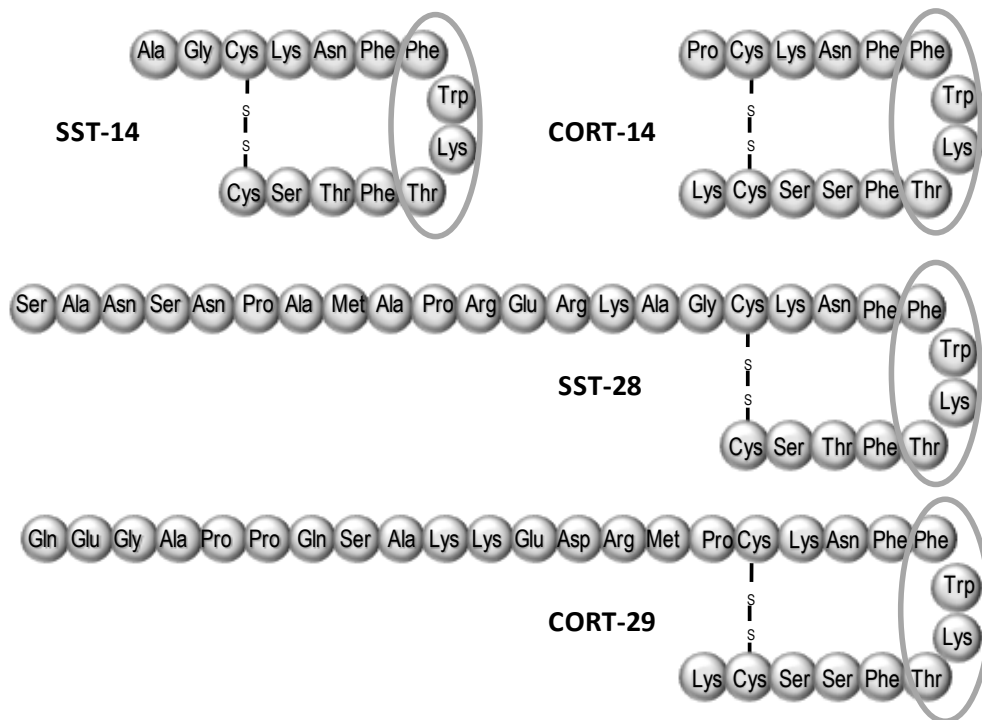


Fig. 7. Representación esquemática de las secuencias aminoacídicas de SST-14 y CORT-14 en roedores.

La cortistatina fue inicialmente descubierta en el córtex cerebral de rata (de Lecea *et al.*, 1996), como su nombre refleja, pero la CORT al igual que la SST, está altamente distribuido a lo largo del organismo en múltiples tejidos. Incluso, además de la equivalencia que ambos péptidos poseen en su estructura y distribución, también la CORT comparte con la SST muchas de sus propiedades funcionales (Broglia *et al.*, 2008; Gahete *et al.*, 2008). Esto es debido a la afinidad subnanomolar que posee la CORT por la unión a los cinco receptores sst1-sst5. Igualmente, se ha demostrado que la CORT también actúa mediante su unión a los receptores truncados de SST, sst2b y algunas variantes del receptor sst5 (Fig.8) (Csaba *et al.*, 2001; Córdoba-Chacón *et al.*, 2010).

Sin embargo, la CORT pero no la SST, puede unirse a otros receptores diferentes a los de SST (Fig. 8). Entre ellos se encuentran el MrgX2 (Robas *et al.*, 2003), un receptor huérfano muy expresado en neuronas del ganglio de la raíz dorsal presente en algunos primates, y el GHS-R1a, un receptor de secretagogos de la GH altamente distribuido, cuyo ligando natural es la ghrelina en su forma acilada (AG) (Kojima *et al.*, 1999; Deghenghi R, 2001; Robas *et al.*, 2003). La unión de la CORT a estos receptores podría explicar las diferencias farmacológicas existentes entre SST y CORT que se detallarán en el Apartado 2.2.

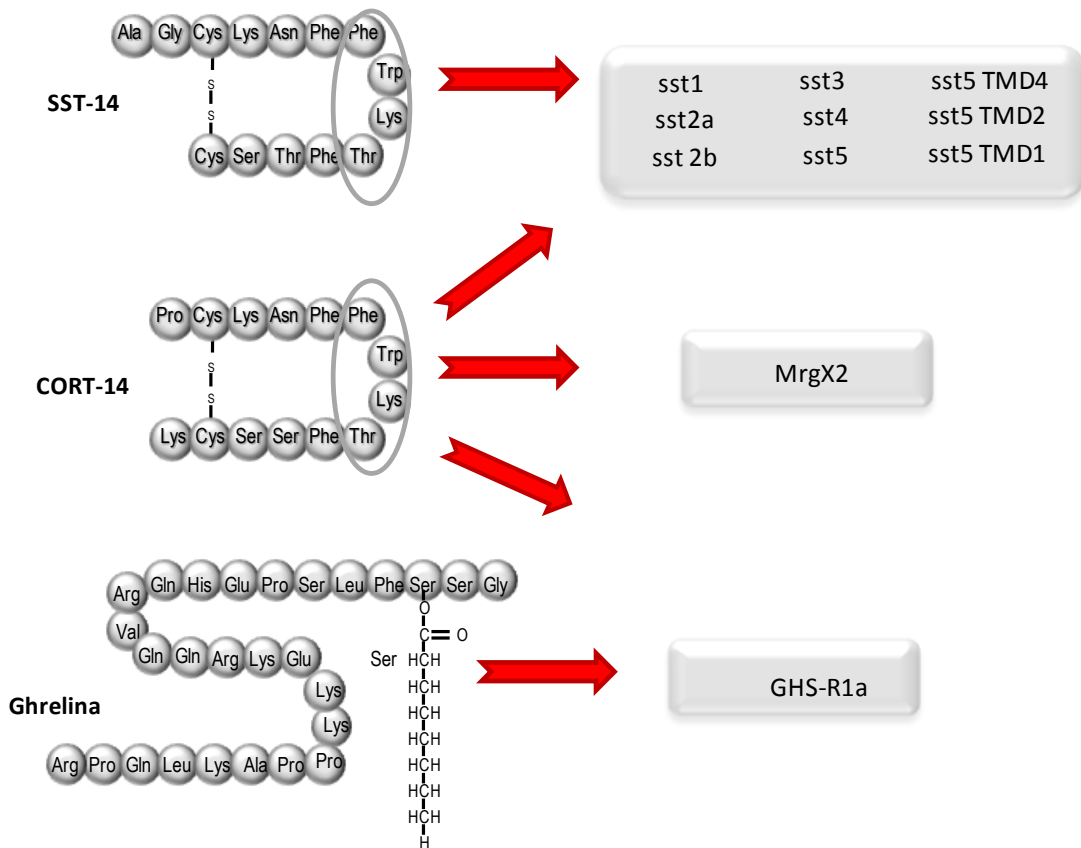


Fig. 8: Esquema de la unión de SST-14 y CORT-14 a sus receptores.

2.4. Acciones biológicas de la Cortistatina.

La CORT se descubrió inicialmente por ser capaz de deprimir la actividad neuronal del córtex y de actuar sobre la actividad moduladora del sueño (de Lecea et al., 1996). Así, interviene directamente sobre neuronas piramidales que provocan un aumento en la producción de ondas de sueño lentas, y como consecuencia un aumento en la eficiencia del sueño (Spier & de Lecea, 2000). No obstante, también se han descrito otras funciones neuromoduladoras de la CORT, provocando una disminución en la retención de memoria y en la actividad de aprendizaje (Fig. 9) (Flood *et al.*, 1997).

Por otro lado, la CORT también actúa como regulador de secreciones endocrinas. De este modo, a nivel hipotalámico-hipofisario provoca una disminución en los niveles de GH basal y estimulada así como en los niveles de ACTH y PRL (Fig. 9), del mismo modo que actúa la SST (Broglia *et al.*, 2002; Luque *et al.*, 2008). A pesar de ello, estudios recientes han descrito que la CORT ejerce un papel estimulador de la liberación de PRL a través del receptor GHS-R1a (Córdoba-Chacón *et al.*, 2011c).

A nivel periférico se ha descrito la extensa distribución de la CORT en un gran número de tejidos (Gahete et al., 2008). Así en el tracto gastrointestinal, la CORT al igual que la SST, regula diferentes procesos entre los que destacan la disminución de la motilidad gastrointestinal, la reducción en la producción de ghrelina del estómago o la participación en la regulación de la insulina pancreática (de Lecea L, 1996; Broglia *et al.*, 2002; Gahete *et al.*, 2008).

Además la CORT ejerce funciones inhibitoras en la producción de factores inflamatorios como interleucinas o el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) en determinadas patologías (Fig. 9) (Gonzalez-Rey *et al.*, 2006 ; Souza-Moreira *et al.*, 2011).

Por otro lado, estudios clínicos recientes sugieren el posible papel regulador de la CORT en relación a enfermedades coronarias, observando niveles altos de CORT plasmática en pacientes que padecen esta enfermedad (Tian *et al.*, 2009).

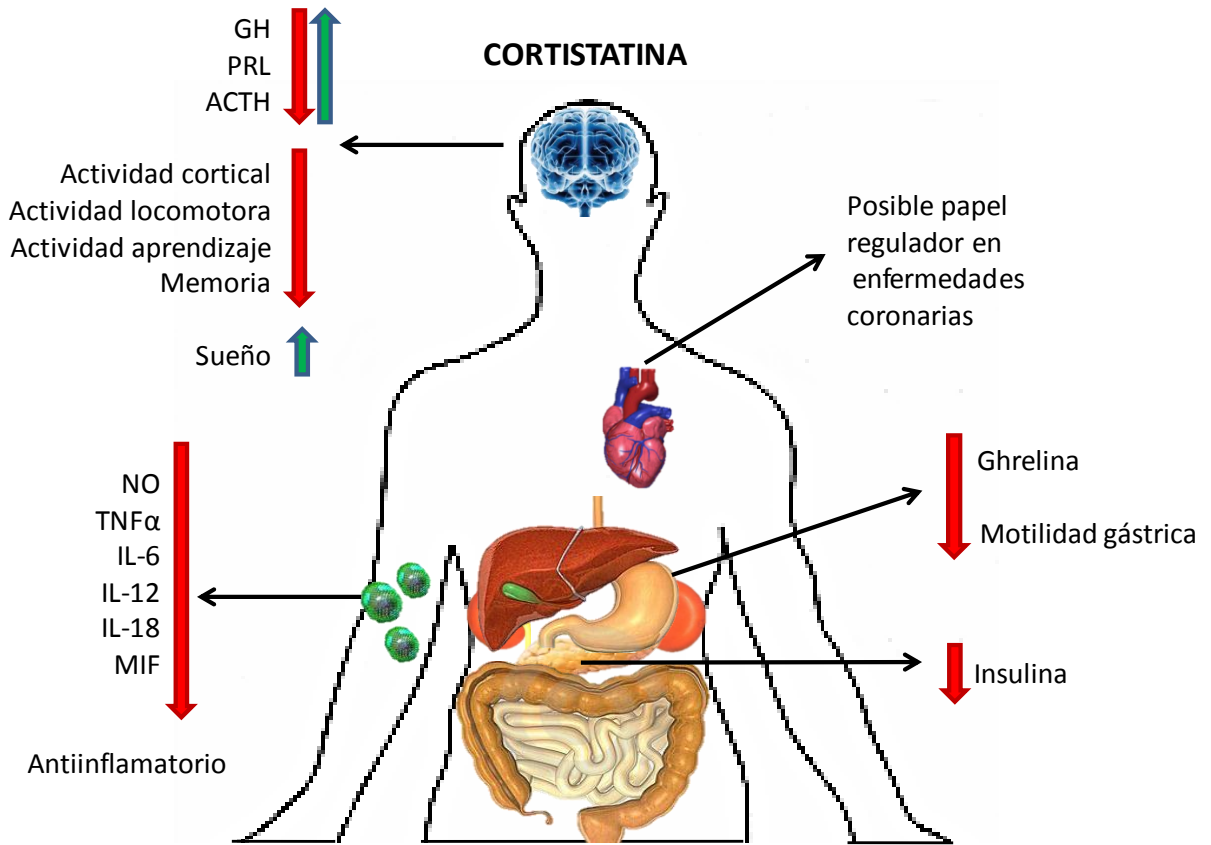


Fig. 9.: Acciones biológicas de la CORT.

3. Sistema ghrelina.

3.1. Componentes del sistema ghrelina.

El gen de la ghrelina, *GHRL*, está formado por 1 exón no codificante (Ex0), 4 exones codificantes (Ex1-4) y 4 intrones (In0-3). Tras los procesos de transcripción y traducción se origina un precursor de 117 aminoácidos denominado pre-proghrelina (Kojima *et al.*, 1999). Éste da lugar a la pro-ghrelina y posteriormente a un producto de 28 aminoácidos, la ghrelina (Fig. 10). Además, durante el procesamiento de transcritos a partir de la pre-proghrelina también se generan múltiples variantes (Seim *et al.*, 2010). Entre ellas destacan la obestatina (Fig. 10), un producto de 23 aminoácidos que proviene de la parte C-terminal del precursor (Zhang *et al.*, 2005), o la des-Glu14-ghrelina, el cual comparte la misma secuencia que la ghrelina excepto por la delección del glutamato en posición 14 de su secuencia (Seim *et al.*, 2010).

Por otra parte, el gen de la ghrelina puede sufrir procesos de *splicing* alternativo generando nuevas variantes truncadas. Este es el caso de una isoforma de la ghrelina que conserva el exón 1 y el exón 2 de la ghrelina, así como la secuencia íntegra del primer intrón en su transcrito, denominándose por ello In1 ghrelina (representado en rojo en la Fig. 10) (Kineman *et al.*, 2007).

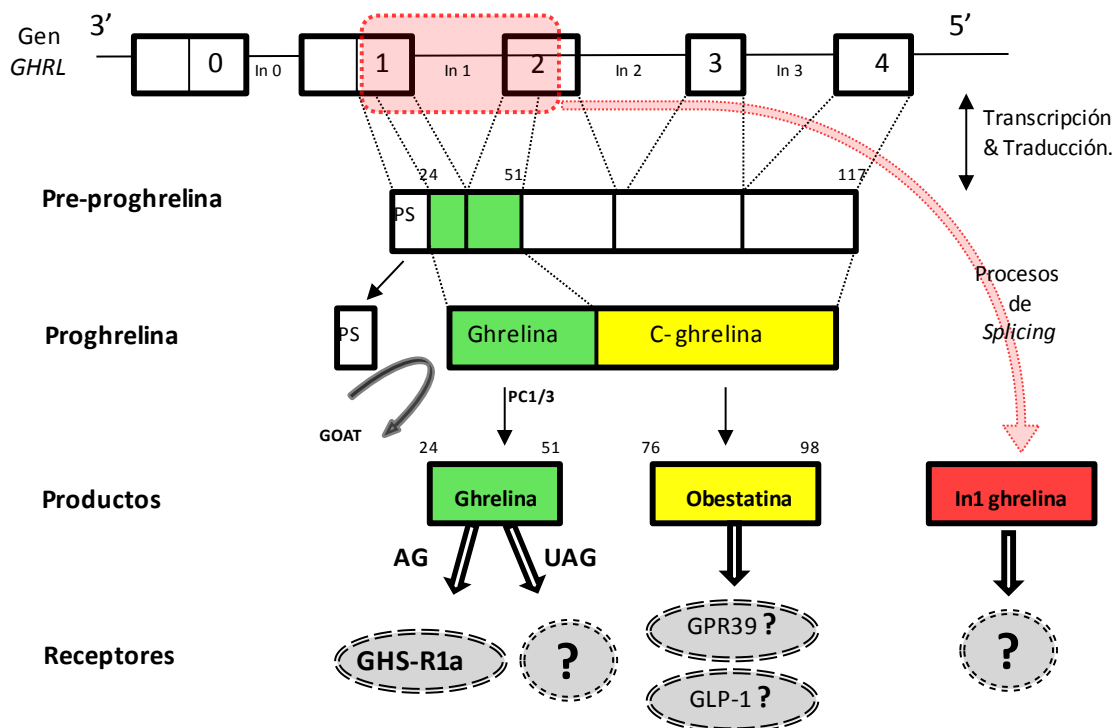


Fig. 10.: Esquema de los productos más relevantes del gen de la ghrelina y de sus receptores propuestos hasta el momento.

La ghrelina es una hormona secretada principalmente en estómago, órgano a partir del cual fue aislada por primera vez por Kojima y su grupo (Kojima *et al.*, 1999). Esta hormona posee la particularidad estructural de estar acilada con un grupo n-octanoilo adherido a la serina (Ser) situada en la tercera posición de su cadena aminoacídica (Fig. 11).

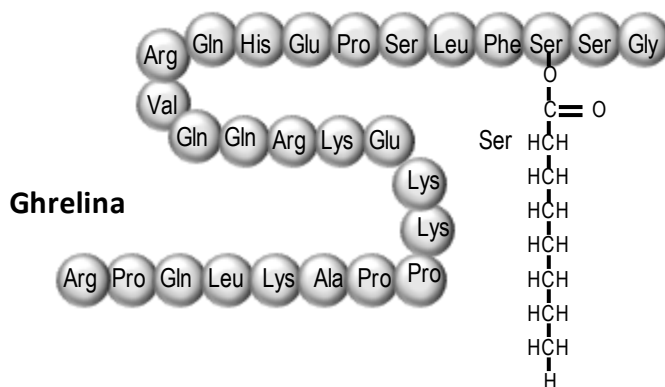


Fig. 11.: Representación de la secuencia aminoacídica de la ghrelina.

La enzima responsable de esterificar esta Ser recibe el nombre de ghrelina O-acetiltransferasa (GOAT) (Gutierrez *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008), una enzima localizada en el retículo endoplasmático que usa los ácidos grasos de la dieta para llevar a cabo su acción (Kojima & Kangawa, 2005b). Esta modificación post-translacional ocurre a nivel de la proghrelina, proceso tras el cual actúa la convertasa prohormona 1/3 (PC1/3) genera la proteína madura (Zhu *et al.*, 2006). Esto convierte a la ghrelina en la primera hormona conocida hasta el momento con dichas características, y cuya forma acilada (AG) es esencial para su unión al receptor de los secretagogos de la GH (GHS-R) y desempeñar sus acciones biológicas (Kojima *et al.*, 1999).

Sin embargo, la ghrelina también puede presentarse como una hormona no acilada por el grupo n-octanoilo en su tercer aminoácido de la cadena, denominada ghrelina desacilada (UAG). Esta isoforma sin modificación en la secuencia no es carente de actividad biológica, puesto que desde su descubrimiento se ha comprobado que puede ejercer actividades similares o distintas a la AG, pese a no unirse al mismo receptor (GHS-R), el cual permanece desconocido hasta el momento (Broglio *et al.*, 2004; Asakawa *et al.*, 2005; Gauna *et al.*, 2005). De hecho, ambas formas están presentes en el torrente circulatorio, siendo la UAG la forma más estable y abundante (Broglio *et al.*, 2004; Hosoda *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2008).

Por otro lado, la transcripción de los dos exones del gen del receptor GHS-R también genera dos isoformas, GHS-R1a y 1b. En primer lugar el transcrito GHS-R1a proviene del procesamiento

de ambos exones generando un producto de 366 aminoácidos. Esta variante pertenece a la familia de receptores GPCR con 7 dominios transmembrana y está presente en numerosos tejidos humanos y de roedores, como corazón, pulmones, intestino, páncreas o tejido adiposo (Guan *et al.*, 1997; Gnanapavan *et al.*, 2002), siendo el cerebro el órgano donde se detecta más expresión (Howard AD, 1996). Además, el GHS-R1a es la variante responsable de mediar las funciones biológicas de la forma acilada de la ghrelina, pero no de la ghrelina desacilada (Howard *et al.*, 1996).

Por otro lado, el transcrito GHS-R1b corresponde con la transcripción de sólo el primer exón de la secuencia del gen, generando una proteína formada por 289 aminoácidos. Curiosamente, esta isoforma truncada contiene únicamente los 5 primeros dominios transmembrana de la variante GHS-R1a (Howard *et al.*, 1996; Kojima & Kangawa, 2005a). La presencia del GHS-R1b no se ha detectado en ratones, habiéndose localizado en humanos un amplio rango de tejidos que expresan esta isoforma, incluso más extensamente que el GHS-R1a (Gnanapavan *et al.*, 2002). A pesar de ello la ghrelina acilada es incapaz de unirse a la variante 1b y sus funciones hasta el momento son desconocidas. No obstante, diversos autores han descrito que ambas isoformas, GHS-R1a y 1b, pueden interactuar entre ellas e incluso con otros receptores, permitiendo así la formación de heterodímeros (Muccioli *et al.*, 2007; Seim *et al.*, 2011).

3.2. Acciones biológicas de la ghrelina.

La mayor fuente de producción de ghrelina en el organismo reside en el estómago, órgano a partir del cual se aisló por primera vez (Kojima *et al.*, 1999). Sin embargo, también se ha descrito su presencia en numerosos tejidos tanto a nivel central como periférico, entre los que se encuentran pulmones, corazón, placenta, ovarios, testículos, hígado, páncreas y otras zonas del aparato digestivo (Kojima *et al.*, 1999; Date *et al.*, 2000; Hosoda *et al.*, 2000; Gnanapavan *et al.*, 2002; Muccioli *et al.*, 2002; Volante *et al.*, 2002).

Debido al amplio patrón de expresión de los distintos componentes de este sistema, se han documentado numerosas acciones biológicas de la ghrelina. Así, a pesar de ser inicialmente identificado como un fuerte estimulador en la liberación de la GH gracias a su unión con el receptor GHS-R (Kojima *et al.*, 1999), hoy en día la ghrelina es considerada una de las hormonas más importantes en el control de la ingesta de alimentos y en el control sobre el metabolismo energético (Fig. 13) (Wren *et al.*, 2001; Briggs & Andrews, 2011). De este modo, ha sido establecido por numerosos autores que los niveles de ghrelina aumentan en el organismo justo antes de las comidas (Cummings *et al.*, 2005; Nogueiras *et al.*, 2010). Además, se ha demostrado que la administración de AG a nivel central o periférico, promueve la ingesta y el

comportamiento asociado con ésta, mientras que la forma desacilada parece ejercer el efecto contrario (Hosoda *et al.*, 2000; Lawrence *et al.*, 2002; Dezaki *et al.*, 2008; Inhoff *et al.*, 2009; Lim *et al.*, 2011). De esta forma, en condiciones fisiológicas los niveles circulantes de ghrelina se encargan de informar a determinadas neuronas del núcleo arcuato del hipotálamo, zona que controla el apetito, del estado energético del organismo, activando vías orexigénicas mediante el receptor GHS-R (Lim *et al.*, 2011). Por ello, puede considerarse a la ghrelina como un péptido fundamental en el estudio de la regulación del peso corporal y de las consecuencias en los trastornos alimenticios (Tschöp *et al.*, 2001; Lawrence *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2004).

Por otra parte existe una gran controversia entre los distintos autores a cerca de regulación que ejerce de la ghrelina sobre la liberación de insulina, sin embargo cada vez más evidencias constatan que la ghrelina es una hormona inhibidora de la secreción de insulina, así como de la SST pancreática, mientras que ejerce una acción estimuladora de las células alfa productoras de glucagón (Fig. 12) (Dezaki *et al.*, 2007; Qader *et al.*, 2008; Egido *et al.*, 2009; Chuang *et al.*, 2011). Esta regulación hormonal a nivel pancreático, explica en parte el control que tiene la ghrelina sobre la homeostasis de la glucosa en el organismo, esencial para el correcto funcionamiento de los tejidos. Por ser objeto de estudio, el papel de la ghrelina sobre el control de la homeostasis de la glucosa, así como de la regulación sobre la función pancreática se detallará en el apartado 4.3.

Aparte de las acciones metabólicas, estudios recientes ponen de manifiesto que la ghrelina es una hormona fuertemente relacionada con el sistema inmunitario, ya que es capaz de provocar un aumento de la producción de células inmunitarias y disminuir la producción de citoquinas inflamatorias (IL-6, IL-1 β o IL-10), quimioquinas y la acción de neutrófilos (Fig. 12) en determinados modelos patológicos (Gonzalez-Rey E, 2010; Granata *et al.*, 2011; Souza-Moreira *et al.*, 2011).

Estudios tanto *in vitro*, como *in vivo* han demostrado los efectos negativos que tiene sobre el eje gonadal, participando así como modulador del sistema reproductor, tanto a nivel sistémico como local, inhibiendo la liberación de GnRH, LH, FSH y causando un retraso en el inicio de la maduración puberal (Furuta *et al.*, 2001; Tena-Sempere *et al.*, 2002; Tena-Sempere, 2005).

Además de su conocido papel estimulante sobre GH, también a nivel hipofisario ha sido descrita su capacidad de aumentar la liberación de ACTH y PRL en la población de células corticotropas y lactotropas respectivamente (Fig. 12) (Kojima *et al.*, 1999; van der Lely *et al.*, 2004; Cordido *et al.*, 2009; Kojima & Kangawa, 2010).

Por último también cabe destacar la intervención de la ghrelina como regulador favorable de la función cardiovascular o en el control de la fisiología gastroenteropancreática (Masuda *et al.*,

2000), así como neuroprotector, estimulador de la actividad de neuronas dopaminérgicas capaces de controlar la actividad locomotora, procesos como el aprendizaje, la memoria o el sueño y otros ritmos biológicos (Fig. 12) (Wren *et al.*, 2001; Broglio *et al.*, 2003; van der Lely *et al.*, 2004; Tena-Sempere, 2005; Baragli *et al.*, 2011; Granata *et al.*, 2011).

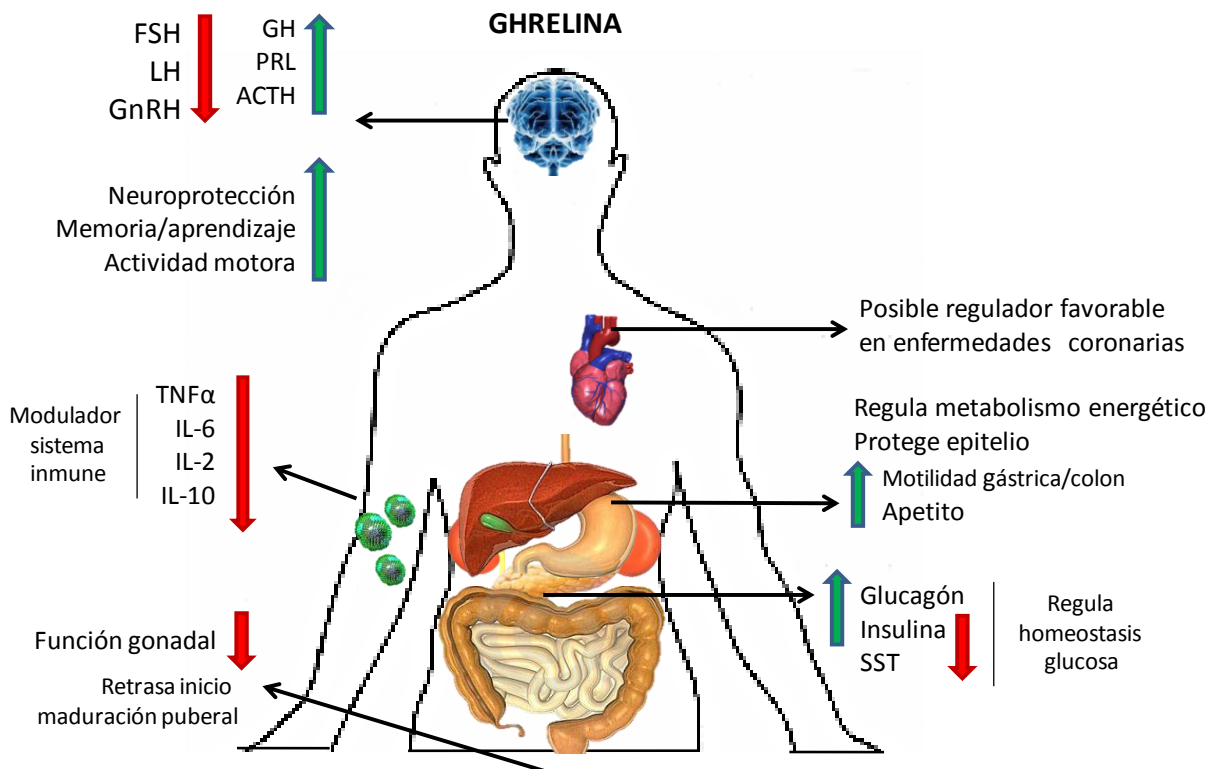


Fig. 12. Acciones biológicas de la ghrelina.

4. Sistema SST/CORT y ghrelina en el páncreas endocrino.

4.1. Sistema SST en el páncreas endocrino.

Unos meses después del descubrimiento de la SST en 1973, Alberti y colaboradores observaron que la SST no sólo se producía y actuaba a nivel hipotalámico, sino que también se expresaba en el páncreas inhibiendo la liberación de insulina (Alberti et al., 1973; Brazeau et al., 1973). El principal producto secretado por las células delta de los páncreas adultos es la SST-14 (Noe, 1981), la cual contribuye con menos del 5% de la SST circulante (Taborsky & Ensink, 1984). Pero además de a la SST-14, la función pancreática también responde a la isoforma de 28 aminoácidos producida en tejidos extra pancreáticos actuando sobre la producción del resto de hormonas (Taborsky, 1983). De acuerdo con ello, ha sido descrito que la célula beta productora de insulina responde preferentemente a la SST-28, mientras que la SST-14 es más específica de la respuesta de la célula alfa. Esto relaciona a la isoforma SST-14 con la inhibición del glucagón, mientras que la inhibición de insulina se asocia con la SST-28 (Mandarino *et al.*, 1981).

La regulación que ejerce la SST sobre la insulina y el glucagón, ayuda a mantener el control de la homeostasis de la glucosa. También de manera recíproca estas hormonas actúan sobre la producción de SST. Así, se ha observado una disminución de los niveles de SST plasmática bajo condiciones de ayuno, viéndose aumentados al doble después de la ingesta. Este aumento en la producción de SST se ha relacionado con mecanismos preventivos frente a la hipersecreción de glucagón e insulina propios de estas condiciones, para así regular la homeostasis de la glucosa y evitar una rápida hipoglucemia en estados post-prandiales (Klaff LJ, 1987; Strowski & Blake, 2008; Hauge-Evans *et al.*, 2009). Por el contrario, algunos autores también han documentado un incremento en los niveles de SST cuando la concentración de glucosa es baja, como consecuencia de la acción conjunta del glucagón y el L-glutamato, un producto co-secretado por la célula alfa (Strowski & Blake, 2008).

Las acciones de la SST se llevan a cabo mediante su unión a los receptores sst1-sst5, lo que explica el gran interés por conocer el patrón de expresión y localización de estos receptores en el páncreas (Chanclón *et al.*, 2012). Esto ha generado una controversia científica que varía en función de los autores, de la especie, de la técnica utilizada y de las condiciones experimentales (Tabla 1). Así, estudios iniciales de inmunohistoquímica (IHQ) localizaron al receptor sst2 y sst5 en las células alfa y beta del islote pancreático de roedores respectivamente. Más tarde se detectó la presencia del sst2 en las células alfa y PP, así como del sst5 en las células beta y delta, y en los últimos años se ha confirmado la presencia de estos dos receptores en los distintos tipos celulares del islote pancreático (Ludvigsen *et al.*, 2004; Ludvigsen *et al.*, 2005; Strowski &

Blake, 2008). Sin embargo, mediante PCR cuantitativa (PCRq) algunos autores han detectado la presencia de todos los receptores de SST excepto del sst4 (Raulf F *et al.*, 1994). En conjunto podría decirse que actualmente la mayoría de los autores confirman la presencia de los cinco receptores de SST en los distintos tipos celulares del páncreas endocrino, tanto en humanos como en roedores, existiendo aún diferentes opiniones en los niveles de expresión entre los principales tipos celulares (Tabla 1) (Strowski & Blake, 2008). Además, recientemente se ha propuesto una posible modulación de su expresión por factores externos como los niveles de glucosa en el medio (Ludvigsen *et al.*, 2011).

Receptor	Especie	Técnica	Tejido	Referencia
Todos excepto sst4	Ratón	PCRq	Páncreas	Raulf <i>et al.</i> , 1994
sst2	Roedor	IHQ	Islotes	Hunyady <i>et al.</i> , 1997
sst5	Roedor	IHQ	Células β	Mitra <i>et al.</i> , 1999
sst1,2,3 y 5	Humano	IHQ	Islotes	Kumar <i>et al.</i> , 1999
sst4			Células β	
Todos	Humano	IHQ	Islotes	Portela-Gomes <i>et al.</i> , 2000
sst5	Humano			
sst2	Humano	IHQ	Islotes	Kimura <i>et al.</i> , 2001
sst2	Roedor	IHQ	Islotes	Kimura <i>et al.</i> , 2001
sst2,3 y 5	Humano	IHQ, FISH y PCRq	Células α , β y δ	Papotti <i>et al.</i> , 2002
Todos	Rata	IHQ	Islotes	Ludvigsen <i>et al.</i> , 2004
Todos	Ratón	IHQ	Islotes	Ludvigsen <i>et al.</i> , 2005
sst2, 3 y 5	Humano	IHQ	Células α y β	Taniyama <i>et al.</i> , 2005
Todos	Ratón	PCRq	Islotes	Hauge-Evans <i>et al.</i> , 2009
sst3	Ratón	IHQ	Islotes	Iwanaga <i>et al.</i> , 2011

Tabla 1: Presencia de los receptores sstr1-5 en el páncreas de roedores y/o humanos detectados por técnicas de inmunohistoquímica (IHQ), PCR cuantitativa a tiempo real (PCRq) e hibridación in situ fluorescente (FISH), según el autor (Tabla modificada de Strowski *et al.*, 2008).

El desarrollo de distintos modelos animales y condiciones experimentales ha ayudado a esclarecer las bases moleculares implicadas en el funcionamiento de estos receptores en el páncreas endocrino. El uso de ratones KO, junto con estudios moleculares de agonistas y antagonistas, han establecido que el sst2 es el responsable de llevar a cabo la inhibición de la SST sobre el glucagón en ratón, así como el sst5 inhibe la secreción de insulina. Por otro lado, en la especie humana el sst2 media la inhibición de insulina y glucagón, estando también implicados el sst1 y sst5 en las acciones inhibitorias de la insulina (Gahete *et al.*, 2010a). La comunidad científica no ha demostrado hasta el momento que el sst3 y sst4 jueguen un papel en

la regulación de la secreción de insulina, no obstante recientemente se ha relacionado la participación del sst3 en señales inhibitorias de la insulina en islotes pancreáticos de ratón (Iwanaga *et al.*, 2011).

4.2. CORT en el páncreas endocrino.

La CORT es un neuropéptido bien conocido por sus propiedades moduladoras del sueño, relacionado además con otras funciones del SNC (de Lecea *et al.*, 1996; Córdoba-Chacón *et al.*, 2011c), sin embargo a nivel pancreático son pocos los estudios existentes.

En el año 2003 el grupo del Dr. Papotti detectó por primera vez la expresión de CORT en 3 de 4 páncreas humanos, localizando su presencia en células individuales del islote (Papotti M, 2003). Dos años más tarde, se localizó a la CORT-17 en las células delta del islote mostrando una co-expresión con la SST-14 en 4 de los 5 páncreas estudiados. Incluso, diversos tipos de tumores neuroendocrinos también han presentado mRNA de CORT mediante PCR cuantitativa (Allia *et al.*, 2005).

Estudios funcionales han documentado que la CORT, al igual que la SST, también actúa de un modo inhibitorio sobre la liberación de insulina y glucagón (Broglia *et al.*, 2002), así como sobre la ghrelina circulante, proponiendo de este modo el posible papel en la regulación del páncreas endocrino de la CORT (Papotti M, 2003). Además, también en pacientes con acromegalias o prolactinomas, CORT y SST regulan del mismo modo la secreción de insulina (Grottoli *et al.*, 2006). Esto podría deberse a la similitud estructural que comparte con la SST y su común afinidad con los receptores sst1-5. Sin embargo, la capacidad de unión de la CORT a otros receptores expresados en páncreas distintos a los de SST como GHS-R y MrgX2 (Robas *et al.*, 2003; Allia *et al.*, 2005; Kageyama *et al.*, 2005), presenta un nuevo abanico de posibilidades en cuanto a los mecanismos moleculares de la CORT en la función pancreática.

4.3. Sistema ghrelina en el páncreas endocrino

El páncreas endocrino es la mayor fuente de ghrelina desde la fase embrionaria hasta justo después del nacimiento. Posteriormente, su producción a nivel pancreático disminuye, a la vez que aumenta progresivamente en el estómago en función de la edad, para proporcionar en la etapa adulta del 65 al 90% de la ghrelina circulante en el organismo (Fig. 13) (Wierup *et al.*, 2002; Wierup *et al.*, 2004; Al Massadi *et al.*, 2011).

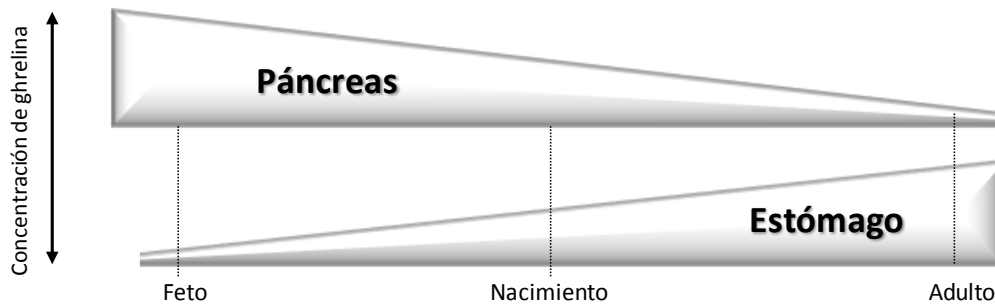


Fig. 13. Concentración de ghrelina en el páncreas y en el estómago.

La secreción de ghrelina en el páncreas se localiza en las células épsilon de los islotes de Langerhans (Prado *et al.*, 2004), aunque mediante técnicas de IHQ también se ha demostrado en ratones su presencia en células alfa productoras de glucagón (Date *et al.*, 2002; Dezaki *et al.*, 2004), en células beta productoras de insulina (Volante *et al.*, 2002) e incluso, se ha observado en ratas que puede co-expresarse con el polipéptido pancreático (PP) (Wierup *et al.*, 2004).

Gracias a estudios de IHQ se ha demostrado la presencia del receptor GHS-R en las células alfa y beta del islote pancreático (Kageyama *et al.*, 2005). Además mediante PCRq también se ha detectado su expresión en páncreas de en distintas especies (Date *et al.*, 2002; Gnanapavan *et al.*, 2002; Volante *et al.*, 2002), así como en líneas celulares beta pancreáticas (Wierup *et al.*, 2004; Granata *et al.*, 2007), lo que augura un relevante papel de la ghrelina en la regulación autocrina y paracrina.

La presencia de la enzima GOAT en los islotes de Langerhans de humanos y roedores también ha sido demostrada (Gutierrez *et al.*, 2008; An *et al.*, 2010). Precisamente, en islotes de ratones se ha confirmado que GOAT no co-localiza con la insulina, por su situación en el islote, y además curiosamente, se ha demostrado que la insulina puede inhibir la expresión de GOAT

mediante la vía *mTOR*, con lo cual, la insulina también podría regular de algún modo la producción de ghrelina acilada (Fig. 14) (An et al., 2010).

Como se ha detallado anteriormente en el apartado 3.2., la ghrelina está considerada una hormona fundamental en el control del metabolismo energético del organismo, que a su vez guarda íntima relación con el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa. No obstante, la acción de la ghrelina sobre la liberación de las hormonas pancreáticas ha provocado diversidad de opiniones. Concretamente en el caso de la insulina, estudios *in vitro* sobre líneas celulares beta pancreáticas y sobre islotes aislados en cultivo, señalan que la ghrelina endógena actúa de un modo directo sobre la célula beta inhibiendo la liberación de insulina inducida por glucosa, mediante la disminución de la vía de señalización de calcio (Fig. 14) (Broglio et al., 2001; Dezaki et al., 2004; Wierup et al., 2004). Recientemente, además se ha demostrado que estos efectos inhibitorios podrían estar mediados en parte por vías de señalización AMPK-UPC2 (An et al., 2010). Incluso, algunos autores sugieren que este efecto puede ser mediado por el receptor GHS-R1a, sin descartar la idea de la existencia de otros posibles receptores implicados (Broglio et al., 2003; Colombo et al., 2003).

Por el contrario, otros autores han descrito muy recientemente, que la ghrelina del islote no influye sobre la secreción de insulina (Bando et al., 2012), e incluso, que ésta podría estimular la secreción de insulina (Fig. 14). Así lo han confirmado estudios *in vivo* en ratas a las que se les ha inyectado ghrelina intravenosa (Lee et al., 2002). Igualmente, estudios *in vitro* han demostrado que la ghrelina en condiciones fisiológicas (10^{-12} M) posee dicho efecto estimulador incrementando los niveles de calcio intracelular en células beta pancreáticas de rata en presencia de altos niveles de glucosa (8,3mmol/l), pero no en niveles basales (Date et al., 2002). A pesar de ello, se ha planteado la hipótesis de que la entrada de calcio no es el único mediador en el efecto estimulador de la ghrelina sobre la secreción de insulina (Adeghate & Ponery, 2002). Además, la ghrelina también se ha definido como una hormona protectora frente a los procesos apoptóticos en cultivo de islotes pancreáticos y líneas beta pancreáticas (Granata et al., 2012b), así como causante de un incremento tanto de la masa celular como del número de células beta (Irako et al., 2006; Kerem et al., 2009).

Como posible explicación de dicho debate se propuso que la ghrelina puede actuar sobre la insulina de un modo dosis-dependiente, no obstante también se han mostrado discrepancias entre los distintos grupos de investigación. Así, Qader expone que la administración en altas dosis (10^{-6} M- 10^{-8} M) puede causar una inhibición de la secreción de insulina pancreática en roedores, mientras que en dosis más bajas (10^{-10} M- 10^{-12} M) estimula su liberación (Qader et al., 2008). Y por el contrario, el grupo de Salehi cuatro años antes demostró en ratón que altas dosis

provocaban una estimulación de la insulina pancreática y bajas dosis causaban su inhibición (Salehi *et al.*, 2004).

Los efectos de la ghrelina sobre el glucagón y otras hormonas endocrinas pancreáticas es también objeto de estudio para muchos grupos de investigación. Se ha descrito que la estimulación del glucagón causado por la administración de ghrelina exógena se podría producir de una forma directa y dependiente a su concentración (Fig. 14) (Salehi *et al.*, 2004; Qader *et al.*, 2005; Chuang *et al.*, 2011). Sin embargo, otros autores han propuesto que dicha liberación de glucagón podría estar mediada indirectamente por la reducción en la secreción de insulina (Dezaki *et al.*, 2004; Dezaki *et al.*, 2008), sin verse implicado el receptor GHS-R (Asakawa *et al.*, 2005).

El efecto de la ghrelina sobre la producción de otras hormonas pancreáticas tales como SST y PP no es tan notorio. Varios autores han observado que la ghrelina acilada, así como la obestatina, inhiben la secreción de SST y PP en islotes de roedores, apuntando que el tipo de receptor responsable de esa respuesta podría tener relación con el que media la inhibición de la insulina (Fig. 14) (Egido *et al.*, 2002; Qader *et al.*, 2008; Egido *et al.*, 2009). Aún así, no todos los autores están de acuerdo en que esa respuesta se deba a un efecto paracrino (Qader *et al.*, 2008). Los estudios basados en el efecto del resto de hormonas pancreáticas sobre la producción de ghrelina son escasos hasta el momento.

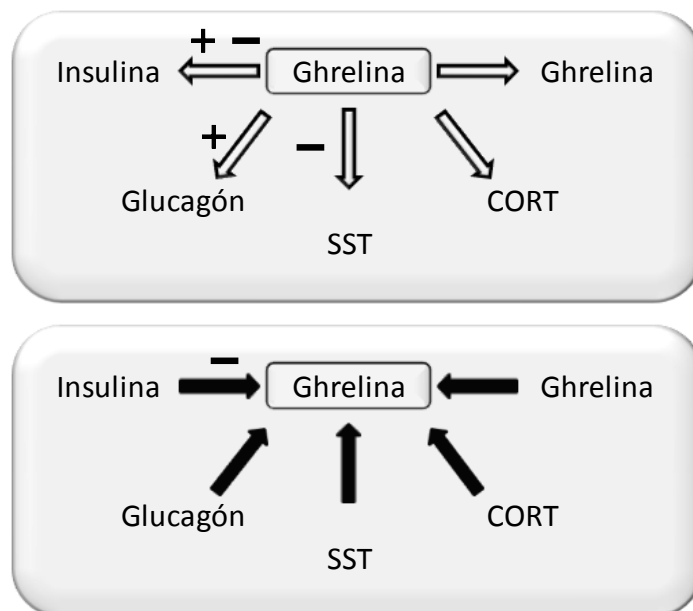


Fig. 14. Relación paracrina y autocrina entre la ghrelina y otras hormonas pancreáticas, indicando en el cuadro superior con flechas blancas el efecto que ejerce la ghrelina pancreática y en el cuadro inferior con flechas negras la acción de otras hormonas pancreáticas sobre la producción de ghrelina de las células epsilon.

5. Papel de SST/CORT y ghrelina en obesidad y diabetes.

5.1. Aspectos generales sobre obesidad y diabetes.

La obesidad se define como la acumulación de grasa corporal causada por la interrupción del balance energético, que se produce cuando la ingesta supera al gasto energético (Hill, 2006). En este caso, el tejido adiposo secreta proteínas y adipocinas como TNF alfa, leptina o adiponectinas que en conjunto, actúan sobre las vías de señalización intracelular de la insulina provocando una disminución en la sensibilidad a insulina, y con ella una reducción de la captación de glucosa en el organismo. Esto provoca una hiperglucemia, que a su vez activa la hiperproducción de insulina por la célula beta del páncreas endocrino, que finalmente resultará en la aparición de resistencia a la insulina por parte del organismo. De ahí que la condición de obesidad esté íntimamente relacionada con los elevados niveles de insulina en sangre y con la resistencia a la insulina (Samuel *et al.*, 2010).

Además, la obesidad puede conducir a estados pro-inflamatorios, siendo por sí misma una condición inflamatoria del tejido adiposo (Gregor & Hotamisligil, 2011). En el caso concreto del páncreas, se ha descrito que la obesidad inducida por la dieta alta en grasa (HFD) produce intolerancia a la glucosa y genera expresión de diversas citoquinas inflamatorias (Ehnes *et al.*, 2007). Dicha actividad inflamatoria puede frenar la supervivencia de la célula beta pancreática y consecuentemente, la producción de insulina (Giannoukakis *et al.*, 2000).

La obesidad, por tanto, está considerada como un serio problema de salud en la que se encuentran implicados numerosos tejidos, como el tejido adiposo, hígado, músculo, páncreas y cerebro (Fig. 15), la cual posee una estrecha relación con el aumento en la prevalencia de enfermedades cardiovasculares, con lipidemia (altos niveles de grasa en sangre) o con diabetes tipo 2 (T2D) (Kopelman, 2000).

Según la OMS, actualmente existen 310 millones de personas con T2D en el mundo y está considerada como la nueva epidemia en los países industrializados. La T2D puede ser generada por una hiperinsulinemia normoglucémica, que provoca una descompensación en la beta célula pancreática imposibilitando la secreción de insulina y/o por la acción deficiente de la insulina sobre los tejidos diana (resistencia a insulina), generando una hiperglucemia crónica. En condiciones en las que se produce una resistencia a la insulina, se requiere que el páncreas endocrino produzca cantidades de insulina mayores para así reducir los niveles de glucosa en sangre. La necesidad de tan alta producción de insulina suele causar una condición de estrés en la célula beta, provocando inicialmente un aumento en su proliferación, dejando a un lado los mecanismos apoptóticos (Ehnes *et al.*, 2007).

Cabe destacar la importancia de la dieta en ambas situaciones metabólicas, ya que la resistencia insulínica está claramente relacionada con la obesidad y la T2D. Curiosamente, no sólo la obesidad aumenta la incidencia de T2D en la población, sino que la gran mayoría de pacientes que sufren T2D pueden desarrollar obesidad, de acuerdo con el Departamento de Salud y Servicios Humanos del Centro de Control y prevención de enfermedades de Atlanta (EE.UU.). De ahí, que recientes estudios han identificado nuevas relaciones entre obesidad y T2D (Eckel et al., 2011). Ambas enfermedades por tanto, tienen en común una serie de anomalías en la función fisiológica entre las que se destacan la resistencia a insulina, la liberación de citoquinas pro-inflamatorias, como IL-6 o TNF alfa por los adipocitos o el páncreas, y el desajuste en la GH hipofisaria (Fig. 15), originando una disminución basal y estimulada de su producción (Cordido *et al.*, 1993; Feldmann *et al.*, 2000; Kahn *et al.*, 2006; Eckel *et al.*, 2011).

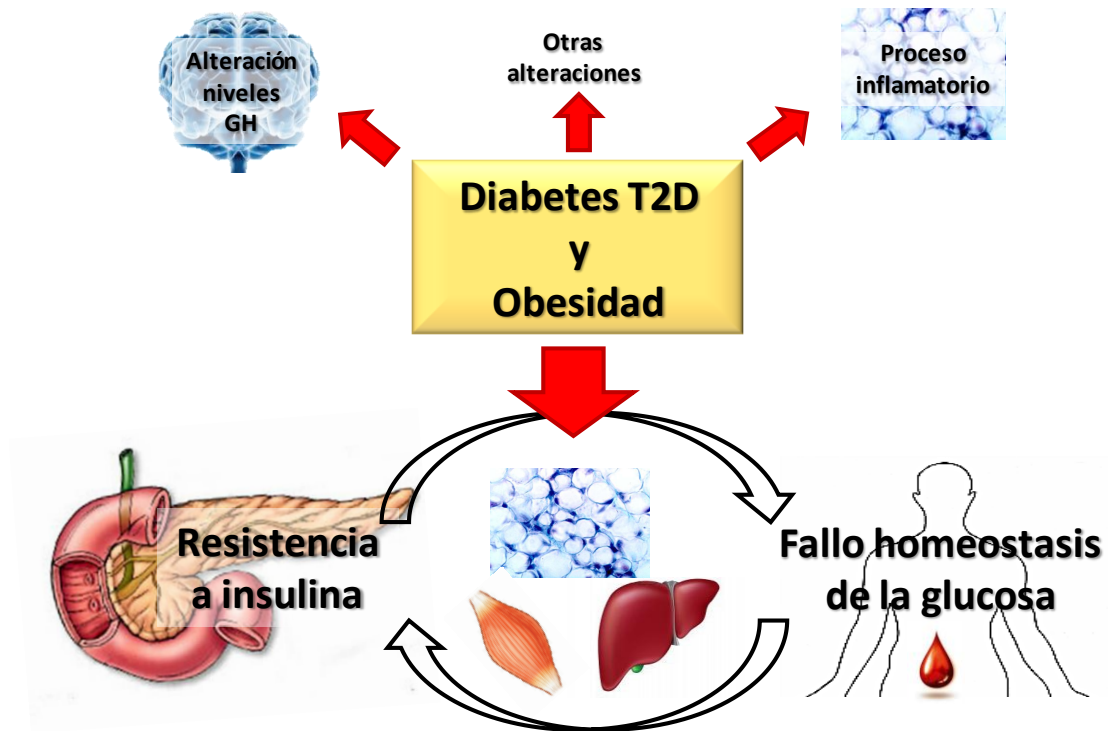


Fig.15. Principales síntomas comunes en la obesidad y la diabetes tipo 2, así como los órganos que se ven afectados.

5.2. Papel de SST y CORT en obesidad y diabetes.

La SST es bien conocido por ser un fuerte represor de la GH inhibiendo su liberación cuando se produce una secreción de SST sostenida en el tiempo, papel que además mejora la sensibilidad a la insulina (Strowski & Blake, 2008). Además, la SST ejerce un potente papel inhibitor sobre las células beta productoras de insulina modulando así su liberación (Engelking, 1997). Teniendo en cuenta que la disminución de la GH es una alteración también relacionada con la obesidad y la diabetes (Kahn *et al.*, 2006; Luque *et al.*, 2006a), y que la hipersecreción y resistencia a insulina es una de las características más evidentes a las que también se han asociado, la SST podría considerarse un péptido clave en el conocimiento de las alteraciones provocadas por estas enfermedades. A pesar de ello, son escasos los estudios que relacionan la SST con estas alteraciones metabólicas.

Algunos autores defienden el papel estimulador de la SST a nivel central sobre el comportamiento de la ingesta de comida en distintas especies (Tachibana *et al.*, 2009), habiéndose propuesto el receptor *sst2* como posible mediador de tal efecto orexigénico (Stengel *et al.*, 2010). A pesar de ello, en modelos de ratones obesos, por la ausencia de leptina (Ob/Ob) o por la ingesta de la dieta (HFD), se ha demostrado que a nivel hipotalámico no existen diferencias en los niveles de mRNA de SST (Luque *et al.*, 2006a). Por otra parte, a nivel pancreático se ha observado que el contenido de SST en ratones obesos que han desarrollado una diabetes espontánea presentan un incremento según algunos autores (Makino *et al.*, 1979). Además, también otros estudios han descrito un aumento del número de células delta pancreáticas en pacientes con diabetes, sin mostrar cambios en los niveles circulantes (Strowski & Blake, 2008). De este modo, la acción inhibitoria de la SST sobre la liberación de hormonas pancreáticas, así como de la absorción de glucosa intestinal, propone un posible papel de la SST en la regulación de la homeostasis de la glucosa en relación con enfermedades como la obesidad o la diabetes (Strowski & Blake, 2008).

La aparición de los análogos sintéticos de SST ha ayudado a estudiar su funcionalidad de un modo más específico. En ensayos preliminares en pacientes obesos a los que se les ha administrado octreótido durante 6 meses, se ha observado una pérdida de peso corporal en 5 de los 8 casos estudiados, donde además la leptina vio reducidos sus niveles, así como GH y IGF-1 (Lustig *et al.*, 2003). Además, su inyección antes de las comidas a pacientes diabéticos con sobrepeso disminuyó los niveles de insulina y glucagón sin verse afectados los niveles hiperglucémicos (Strowski & Blake, 2008). Además, un estudio en ratas a las que se les ha inyectado de forma intracerebroventricular durante 14 días otro análogo de la SST, el ODT8, ha confirmado que la ganancia de peso en ratas obesas y los niveles circulantes de GH se ven

disminuidos (Stengel et al., 2011). El conjunto de estos datos sugiere que la SST puede considerarse un péptido clave en la regulación celular y molecular de estas situaciones metabólicas (Strowski & Blake, 2008).

Pese a conocer la implicación de los receptores sst1, sst2 y sst5 en la inhibición de la secreción de insulina, se desconocen los mecanismos que provocan estas enfermedades y la implicación de otros receptores de SST. La presencia de los distintos receptores en los tipos celulares del islote es variable en función de si el modelo estudiado es diabético o no. Así, se ha observado que en las células alfa, delta y células productoras del polipéptido pancreático, se redujo la expresión de dos o más receptores en islotes de humanos diabéticos (Portela-Gomes et al., 2010). Por otro lado, el bloqueo del receptor sst5 de la célula beta pancreática, además de aumentar la liberación de insulina, decrece la ganancia de peso y aminora la resistencia a insulina creada en un estado de obesidad inducida por dietas altas en grasas (Strowski *et al.*, 2003; Hansen *et al.*, 2004). Esto se convierte por tanto, en una herramienta para el estudio y el posible desarrollo de nuevas terapias contra la hiperinsulinemia en la obesidad y T2D (Boehm & Lustig, 2002; Tzotzas T, 2008).

La CORT comparte con la SST los efectos inhibitorios sobre la secreción de GH en condiciones fisiológicas y patológicas, así como sobre la insulina (Broglia *et al.*, 2002; Benso A, 2003). Por un lado, estos indicios podrían sugerir que la CORT participa como una molécula análoga de la SST. Sin embargo han sido publicados numerosos resultados que se contraponen con esta teoría, probablemente como resultado de su unión al receptor GHS-R (de Lecea & Castano, 2006). Concretamente, mediante dicho receptor se ha descrito que la CORT, pero no la SST, es capaz de disminuir citoquinas implicadas en la inflamación producida por estas enfermedades, como IL-6 y TNF-alfa (Gonzalez-Rey *et al.*, 2006 ; Eckel *et al.*, 2011). Así, CORT y SST podrían actuar de forma coordinada en estados fisiopatológicos como los que nos conciernen en el presente estudio. No obstante, hasta el momento los estudios que relacionan a la CORT con la obesidad y la T2D son limitados e insuficientes para conocer el papel que desempeña y esclarecer los mecanismos implicados en su regulación.

5.3. Papel de ghrelina en obesidad y diabetes.

Ha sido ampliamente descrito el papel regulador del sistema ghrelina sobre la liberación de insulina y de la homeostasis de la glucosa (Apartado 4.3.). Así, se ha demostrado que el bloqueo de algunos componentes de este sistema modifica la función beta pancreática en determinados desórdenes metabólicos, como en la diabetes (Esler *et al.*, 2007). En esta enfermedad se produce una disfunción de la célula beta pancreática que conduce a una descompensación en la liberación de insulina causando resistencia y un aumento en los niveles de glucosa en sangre. Diversos estudios han confirmado que tanto la ghrelina como otros productos del gen de la ghrelina, ayudan a adecuar los niveles de glucosa, a la vez que protegen y regeneran la masa celular del islote de ratas con diabetes inducida por estreptozotocina (STZ), ofreciendo un potencial terapéutico y preventivo frente a la T2D (Irako *et al.*, 2006; Granata *et al.*, 2010b).

Por otra parte, la ghrelina además es la única hormona conocida hasta el momento con función estimuladora del apetito, y por tanto, involucrada en el aumento de peso y en la obesidad (Tschöp *et al.*, 2000; Wren *et al.*, 2001; Lawrence *et al.*, 2002). Se ha demostrado que su administración durante periodos largos de tiempo promueve la ganancia de peso, no sólo por estimular la ingesta, sino también por facilitar la asimilación de la dieta alta en grasas (Shimbara *et al.*, 2004). También los niveles circulantes de ghrelina disminuyen la utilización de depósitos de tejido adiposo blanco (WAT) (Davies *et al.*, 2009) y reduce la apoptosis en adipocitos (Kim *et al.*, 2004). Además, una alteración característica que aparece tanto en obesidad como en diabetes es la resistencia a la insulina. En este sentido, por ser la ghrelina capaz de modular los niveles de glucosa y la liberación de insulina se convierte en un péptido directamente implicado en los mecanismos responsables en su desarrollo (Al Massadi *et al.*, 2011).

En condiciones metabólicas normales bajo una situación hipoglucémica la concentración de ghrelina se encuentra elevada. Tras la ingesta de alimento estos niveles disminuyen, mientras el nivel de insulina y glucosa en sangre asciende (Angelidis *et al.*, 2010). Algunos autores han propuesto que esta disminución en la concentración de ghrelina puede deberse en parte al efecto negativo que ejerce la insulina sobre su producción (Saad *et al.*, 2002; Solomon *et al.*, 2008; Chanclón *et al.*, 2012).

En el caso de la obesidad o la diabetes se ha comprobado que pese a seguir el mismo patrón de comportamiento antes y después de las comidas, los niveles de ghrelina circulante son inferiores a los de los individuos sanos. Esta diferencia podría ser causada por la resistencia a la insulina propia en estas enfermedades y su consecuente aumento en los niveles plasmáticos (Sun *et al.*, 2006; Baragli *et al.*, 2011). En tales desajustes metabólicos se ha descrito que el bloqueo de algunos productos del gen de la ghrelina provoca la liberación de insulina y mejora la

hiperglucemia en ratones (Sun *et al.*, 2006). Además, se ha publicado recientemente que el tratamiento con ghrelina y obestatina hace mejorar la tolerancia de la glucosa y reduce la resistencia a la insulina causada por factores diabetogénicos o por la obesidad inducida por dieta alta en grasas en ratas (Granata *et al.*, 2010a; Granata *et al.*, 2012b).

La anulación del receptor GHS-R en ratones ha inducido una mayor sensibilidad a la insulina (Gómez *et al.*, 2009). En otros estudios con antagonistas de GHS-R se ha mostrado una mejora en la pérdida de peso y se ha suprimido el apetito (Zorrilla *et al.*, 2006), indicando la implicación de este receptor en la desregulación producida en estas enfermedades. En otros estudios farmacológicos se ha demostrado que en la obesidad inducida por la dieta la ausencia este receptor y de la propia ghrelina ha conducido a una disminución del apetito y de la ingesta de comida (Wortley *et al.*, 2005; Schellekens *et al.*, 2010; Chanclón *et al.*, 2012). Sin embargo el fenotipo de la obesidad no se ha visto modificado por la falta de ghrelina en ratones KO, pese a mejorar la sensibilidad a la insulina y la tolerancia a la glucosa (Zigman *et al.*, 2005).

Se ha demostrado que la acilación de la ghrelina es necesaria para su función en la obesidad. Así, por el contrario la ghrelina desacilada (UAG) no posee tal capacidad orexigénica (Asakawa *et al.*, 2005; Inhoff *et al.*, 2008) ni presenta los mismos cambios en la obesidad abdominal que la isoforma acilada (Davies *et al.*, 2009). De hecho, se ha propuesto que el tratamiento con inhibidores de la enzima responsable de su activación, GOAT, podría implicar la ganancia de peso y por lo tanto una posible terapia en la lucha contra la obesidad (Gualillo *et al.*, 2008; Barnett *et al.*, 2010; Chanclón *et al.*, 2012).

El Intrón 1 (In1), descubierto en 2007 y denominado originalmente Intrón 2 de ghrelina (In2), es una isoforma identificada en hipotálamo e hipófisis de ratón cuando se pretendía estudiar la modulación de la expresión de la ghrelina mediante diversos estados metabólicos (Kineman *et al.*, 2007). Pese a la no existencia de estudios que avancen en su posible papel en la obesidad, se ha detectado su expresión en otros tejidos de un modo dependiente al mal pronóstico de otras enfermedades como en el caso de los tumores. Esto propone a esta variante de la ghrelina como un novedoso blanco en el estudio del sistema ghrelina frente a la obesidad (Gahete *et al.*, 2011).

Los cambios producidos en el sistema ghrelina por la obesidad y la diabetes se han producido tanto a nivel sistémico como a nivel de tejidos (Sahin *et al.*, 2011; Aydin *et al.*, 2012), y en conjunto todo ello ayuda a contribuir al conjunto de mecanismos adaptativos para alcanzar un correcto funcionamiento en la homeostasis de la glucosa. Por todo ello, en estos últimos años el sistema ghrelina está generando una gran expectación en el desarrollo de aplicaciones clínicas frente a la T2D, la obesidad y la resistencia a insulina.

5.4. Caracterización de los animales CORT-KO.

Como se ha descrito en apartados anteriores, se conocen diversas funciones de la CORT a nivel central y periférico, sin embargo la información existente sobre su relación con la obesidad y la diabetes es limitada. No obstante, un estudio reciente en un modelo de animales *knockouts* en el gen que codifica la CORT ha mostrado datos preliminares indicativos de su posible relación con estas enfermedades. Así, animales que carecen en su genotipo de la CORT presentan resistencia a la insulina, mostrando un aumento en los niveles de glucosa transcurridos 60 y 120 min tras la inyección de insulina (Córdoba-Chacón *et al.*, 2011c). Esta respuesta es exclusiva de los machos, puesto que las hembras reducen correctamente el nivel de glucosa tras la inyección de insulina. El hecho de que la falta de CORT en los machos produzca tales consecuencias implica su participación en la regulación de la homeostasis de la glucosa y de la insulina. A pesar de ello, los niveles circulantes de insulina no se han visto alterados como consecuencia de la ausencia de CORT ni en machos ni en hembras (Córdoba-Chacón *et al.*, 2011c). Tampoco los niveles plasmáticos de glucosa ni los niveles de glucagón han mostrado diferencias como consecuencia de la ausencia o no de CORT (Córdoba-Chacón *et al.*, 2011c). Incluso, el test de tolerancia a la glucosa (GTT) en estos animales tampoco ha revelado alguna alteración en sus niveles tras la inyección de glucosa a los 15,30,60 ó 120 min (Córdoba-Chacón *et al.*, 2011c).

Bajo condiciones metabólicas extremas como la obesidad, la hiperinsulinemia ha sido ampliamente demostrada en numerosas ocasiones, independientemente de la edad del animal en la que comienza dicha alteración (Córdoba-Chacón *et al.*, 2012b). Además del aumento en los niveles de insulina mostrado en animales WT, la dieta HFD también han provocado hiperglucemia, como ha sido anteriormente publicado en el genotipo WT (Juonala *et al.*, 2011; Córdoba-Chacón *et al.*, 2012b). A pesar de ello, las consecuencias de la falta de CORT en esta desregulación metabólica no ha sido documentado hasta el momento.

A pesar de ser escasos los trabajos realizados en estos animales también se han descrito variaciones de algunos componentes de los sistemas objeto de nuestro estudio. De este modo, aunque no se han mostrado alteraciones significativas en los niveles de SST circulante en condiciones metabólicas normales en animales carentes de CORT, se ha observado una tendencia a reducir sus niveles plasmáticos en los ratones macho CORT-KO (Córdoba-Chacón, *et al* 2011). Por otro lado, en situaciones de obesidad el sistema SST no ha sido estudiado hasta el momento, ni en el genotipo silvestre ni en el genotipo CORT-KO.

Ha sido demostrada la capacidad de unión de la CORT al receptor de la ghrelina, GHS-R, mostrando de este modo una interrelación funcional entre el sistema ghrelina y la CORT (Gonzalez-Rey E, 2010; Córdoba-Chacón *et al.*, 2011c). Debido este nexo de unión también se

han realizado estudios preliminares sobre su posible alteración en ratones carentes de CORT. Así, el análisis de los niveles de ghrelina en los animales macho con genotipo carente en CORT ha confirmado que los ng/ml de ghrelina total y acilada curiosamente no se han visto alterados con respecto al genotipo WT. Por el contrario, las hembras han mostrado un aumento significativo de la ghrelina total y acilada, como consecuencia de la falta de CORT. Este incremento producido en las hembras y no en los machos, junto con la resistencia a la insulina observada únicamente en los machos de este modelo experimental, apoya la hipótesis del papel protector que tiene la ghrelina sobre la función pancreática (Granata *et al.*, 2010a) y la importancia de la CORT en su regulación (Córdoba-Chacón *et al.*, 2011).

Además, los niveles circulantes de ghrelina se han mostrado alterados bajo diferentes condiciones de obesidad (Gahete *et al.*, 2010b). Incluso, su concentración en plasma varía dependiendo de la edad del animal en la que se ha inducido la obesidad, como ha sido publicado recientemente. Así, se ha observado que los machos WT con DIO desde la edad adulta tienen disminuidos los niveles plasmáticos de ghrelina total, mientras que en animales obesos jóvenes no se ha observado tal reducción (Córdoba-Chacón *et al.*, 2012b). La falta de CORT en estas condiciones no ha sido estudiado hasta el momento, no obstante su estudio en este modelo experimental ofrece numerosas expectativas y augura un amplio abanico de posibilidades en el conocimiento del mecanismo de acción de la CORT.

Objetivos

La función pancreática está sometida a sistemas de regulación específicos que controlan el mantenimiento de los niveles adecuados de glucosa y del metabolismo energético en el organismo. Entre factores se pueden incluir a los distintos componentes de los sistemas SST/CORT y ghrelina, sistemas altamente interrelacionados capaces de regular la liberación de las distintas hormonas pancreáticas. La desregulación de la función pancreática provoca la aparición de diabetes y otras patologías nefastas para el organismo. En el caso de la obesidad o la diabetes el organismo sufre una desregulación metabólica que desencadena varias alteraciones, entre las que destaca la resistencia a la insulina. Como se ha detallado en la introducción, la falta de CORT en ratones también provoca resistencia a la insulina indicando una relación entre la desregulación en la función pancreática y la CORT, siendo posible candidata en el desarrollo de futuras dianas contra las enfermedades del siglo XXI.

Así, el **objetivo general** de este estudio es profundizar en el conocimiento de las funciones que desempeñan las hormonas de los sistemas SST/CORT y ghrelina en el páncreas bajo diferentes condiciones metabólicas y determinar la influencia de la ausencia de CORT en sus niveles de expresión en esta glándula.

Para alcanzar dicho objetivo general, se fijaron los siguientes **objetivos específicos**:

1. Establecer y caracterizar el perfil de expresión a nivel pancreático de los componentes de los sistemas formado por SST/CORT y ghrelina en ratones CORT-KO y sus respectivos controles en condiciones normales y en animales sometidos a condiciones de obesidad y ayuno.
2. Determinar el papel de la SST y la CORT a nivel pancreático en alteraciones metabólicas como la deficiencia nutricional (ayuno) y la obesidad inducida en ratones carentes de la expresión de CORT.
3. Evaluar funcional y molecularmente los componentes del sistema regulador formado por SST/CORT, ghrelina y sus receptores en la modulación de la función endocrina del páncreas en islotes WT y CORT-KO en respuesta al tratamiento con CORT y bajo condiciones de obesidad.

Objectives

Pancreatic function is subject to specific regulatory systems that regulates the maintenance of adequate levels of glucose and energy metabolism in the organism. Among such factors it could be included different components of SST/CORT and ghrelin systems, which are highly interrelated systems capable of regulating the release of different pancreatic hormones. The deregulation of pancreatic function causes the onset of diabetes and other dire conditions for the organism. In the case of obesity or diabetes the organism suffers a metabolic deregulation that triggers several alterations, notably the insulin resistance. As mentioned in the introduction, the lack of CORT in mice also causes insulin resistance indicating a relationship between deregulation in pancreatic function and the CORT, being a possible candidate in the development of future targets against diseases of the 21st century.

Thus, the **general objective** of this study is deepening the knowledge of the roles played by hormones ghrelin and SST/CORT systems in the pancreas under different metabolic conditions and determine the influence of the absence of CORT in their levels of expression in this gland.

To achieve this overall objective, the following **specific objectives** were set:

1. Establish and characterize the expression profile at the pancreatic level of components formed by SST/CORT and ghrelin systems in CORT-Knockout mice and their respective control in normal conditions and in animals subjected to obesity and fasting conditions.
2. To determine the role of SST and CORT at the pancreatic level in metabolic disturbances such as nutritional deficiency (fasting) and obesity induced in mice lacking expression of CORT.
3. Evaluate molecularly and functionally components of the regulatory system comprising SST/CORT, ghrelin and its receptors in the modulation of the endocrine pancreatic function in islets from WT and CORT-KO mice in response to treatment with CORT and under conditions of obesity.

Material y métodos

1. Animales de experimentación.

1.1. Gestión de la colonia.

En la presente Tesis hemos trabajado con 3 modelos de animales: 1) ratones C57Bl/6J carentes del gen de la cortistatina (CORT-KO) e inicialmente proporcionados por el Dr. Luis de Lecea (*The Scripps Research Institute*, California, USA) (Tallent et al., 2005) y 2) ratones C57Bl/6J sin modificación genética (wild-type; WT).

Tras un periodo inicial de cuarentena, se instauró una colonia de cada uno de los genotipos en el animalario del Campus de Rabanales de la Universidad de Córdoba. La manipulación de los mismos se realizó según la legislación vigente, aprobada en Mayo del 2002 por la Junta de Andalucía y siguiendo las directrices del Comité Ético de la Universidad de Córdoba.

Con objeto de incrementar el tamaño de la colonia, se cruzaron ratones de los genotipos wild-type (WT; +/+) con *knock out* en cortistatina (CORT-KO; -/-). Tras el apareamiento, el estado de las hembras se controló diariamente mediante el seguimiento del “tapón vaginal”, indicativo del estado de preñez. En este momento, las hembras preñadas se aislaron de los machos y se acomodaron con un algodón que pudiera mantener la temperatura de las futuras crías. Tras 21 días de gestación, la descendencia de estos cruzamientos (heterocigotos; +/-) se utilizó para aumentar el tamaño de la colonia una vez alcanzada la madurez sexual y así obtener los animales de los genotipos WT (+/+) y CORT-KO (-/-).

La separación de las crías de sus madres, proceso denominado “*weaning*” o “destete”, se realizó a las 3 semanas de su nacimiento. En ese momento también se realizó la separación de sexo y se procedió al marcaje de cada ratón mediante una pequeña incisión en las orejas derecha (R), izquierda (I), en ambas (R/L) o en ninguna (N). Además, a cada ratón se le asignó un número $n + 1$, siendo n el número correspondiente al último ratón, y estableciéndose esta numeración en función de la fecha de nacimiento. La información de cada animal se registró en el cuaderno de laboratorio así como en las tarjetas identificativas de cada jaula, apareciendo así reflejada la fecha de nacimiento, consanguinidad, marca y número. Por último, se obtuvo un pequeño fragmento de la cola para proceder a su genotipado, tal y como se indica en el siguiente apartado.

1.2. Genotipado.

Con objeto de identificar genéticamente cada uno de los animales de los modelos estudiados, se seccionó aproximadamente 0,5 cm de la cola o, excepcionalmente, una pequeña parte de la oreja. En todo momento se vigiló escrupulosamente la limpieza del material de laboratorio (etanol 70%) así como de la cola u oreja de cada ratón antes y después del corte para prevenir posibles contaminaciones que pudieran conllevar a errores en el genotipado de cada animal. Las muestras así obtenidas se almacenaron a -20 °C hasta el día en que se realizó la extracción de ADN (Luque RM., 2007). Se añadieron 450 µl de buffer de digestión (compuesto por Tris-HCl 1M, EDTA a pH 8.0, NaCl 5M, SDS al 10% y agua autoclavada) y 25 µl de proteinasa K (20 mg/ml; Invitrogen, Barcelona, España), se agitó vigorosamente y se mantuvo a 55 °C en estufa durante toda la noche para su completa digestión.

Al día siguiente, a cada tubo se le añadió 190 µl de NaCl y se centrifugó a 13000 rpm durante 15 min para el precipitado de las proteínas. A continuación, se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo, al que se le añadió 650 µl de isopropanol (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, EE.UU.). Al invertir el tubo suavemente se pudo distinguir un entramado blanquecino correspondiente al ADN genómico. La muestra se centrifugó nuevamente durante 20 min y se añadieron 500 µl de etanol al 70% para el lavado de ADN. Tras una nueva centrifugación (13.000 rpm/10 min) se retiró el sobrenadante y la pella se dejó secar durante unos minutos. Posteriormente, se resuspendió en 250 µl de Tris 10mM (pH 8.0) y el ADN se mantuvo durante 24 horas en dicha solución. Finalmente, la concentración de DNA en cada tubo se determinó por espectrofotometría a 260 nm mediante NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dinamarca). La verificación del genotipo de cada animal se realizó a partir de 35 ng de ADN genómico/µl mediante PCR convencional (Luque et al., 2006).

1.2.1. Genotipado de ratones CORT-KO.

En la reacción de la PCR para animales procedentes de la colonia CORT-KO se utilizaron 12,5 µl de Máster Mix (Fermentas, Hanover, EE.UU.), 8,5 µl de agua destilada, 1 µl de la muestra (35 ng/µl) y 1 µl de cada *primer* (10 mM) por cada reacción. El perfil de temperatura para la PCR fue el siguiente: un ciclo inicial de 94°C durante 10 min seguido de 40 ciclos de 94 °C/30 s 61 °C/30 s y 72 °C/30 s y un último ciclo de extensión a 72 °C durante 10 min.

La electroforesis de los productos de PCR se llevó a cabo en un gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio (0,05 µl/ml) a 60-70 V durante 40 min aproximadamente. La observación de los geles se realizó en un transiluminador de luz ultravioleta (Bio Rad, Barcelona, España) que nos permitió visualizar y fotografiar los transcritos obtenidos tras la PCR. Así, la banda de 300

pares de bases (pb) resultó indicativa del genotipo WT (+/+), el fragmento de 158 pb identificaba el genotipo CORT-KO (-/-). La presencia de ambos transcritos en la misma muestra correspondía al genotipo heterocigoto (+/-) (Fig. 16).

Los *primers* usados en la verificación del genotipo son los que se ilustran en la Fig. 16. El par de *primers* Ex1Flox y SalFlox fue diseñado por el Dr. de Lecea y amplifica específicamente productos de 300 pb en el alelo KO. En nuestro laboratorio, hemos diseñado además un tercer *primer* (As 1510) en la secuencia de la CORT y consecuentemente usado para la caracterización del alelo WT. El par formado por As1510 y Ex1Flox genera un producto de 154 pb. Los *primers* se diseñaron mediante el programa *Primer3* (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) usando la secuencia de ARN mensajero del gen de la CORT de ratón (NM_007745) disponible en la base de datos del *National Center of Biotechnology Information* (NCBI).

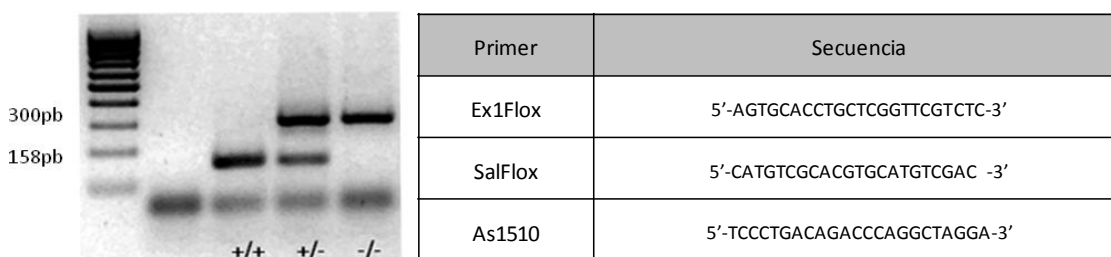


Fig. 16. Imagen de un gel de genotipado para el gen CORT representando bandas de 300 y 158 pb. Secuencias de los *primers* usados en la caracterización del genotipo CORT-KO.

2. **Toma de muestras y diseño experimental.**

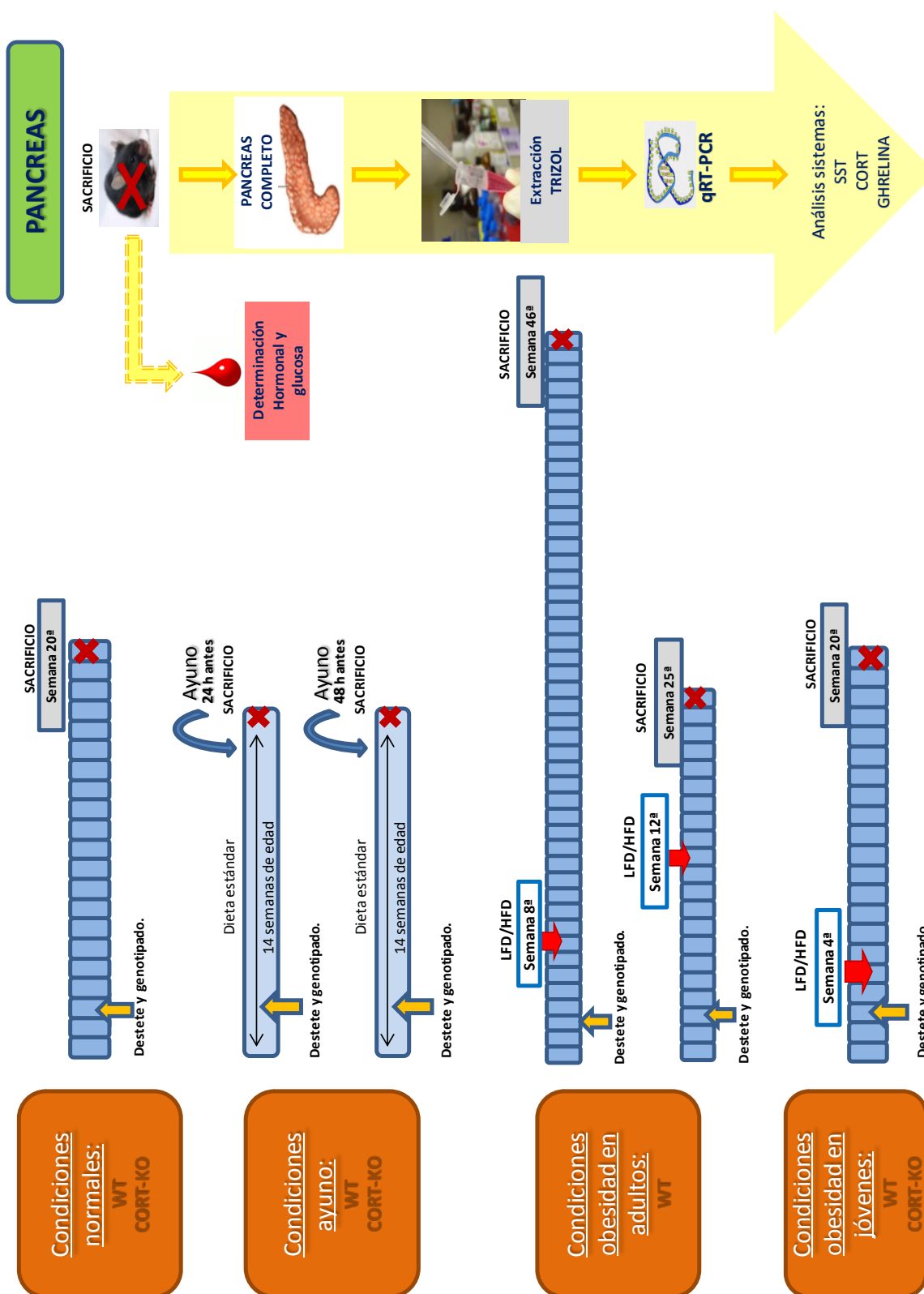


Fig. 17: Esquema ilustrativo del diseño experimental de los diferentes grupos de animales, así como de la toma y procesamiento del páncreas (LFD/HFD: dieta baja/ alta en grasa respectivamente).

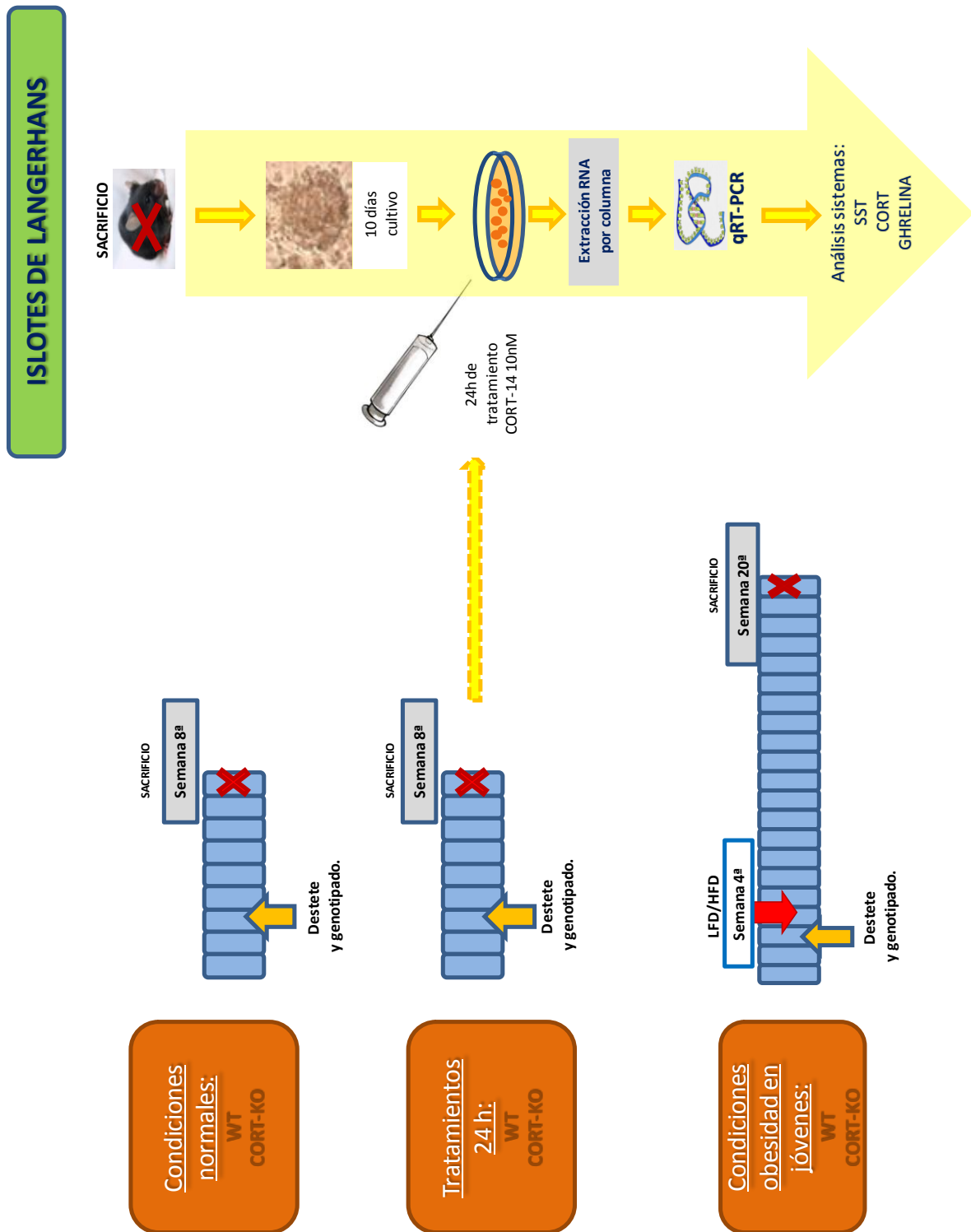


Fig. 18: Esquema ilustrativo del diseño experimental de los diferentes grupos de animales, así como de la toma y procesamiento de los islotes pancreáticos (LFD/HFD: dieta baja/alta en grasa).

2.1. Toma de muestras.

El sacrificio de los animales usados en este trabajo se realizó por decapitación y/o dislocación cervical en las instalaciones del animalario de la Universidad de Córdoba. A continuación se procedió a la extracción del páncreas, que bien se procesó inmediatamente para el aislamiento de ARN, o bien, se preservó para su traslado a las instalaciones del Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología donde se realizó el aislamiento de islotes.

2.1.1. Extracción del páncreas.

Para su extracción se realizó un corte longitudinal en el abdomen del animal y una vez localizado se procedió a su extracción. A continuación, el páncreas bien se sumergió inmediatamente en *Trizol Reagent* (Invitrogen) para la extracción del ARN, o bien se preservó en una solución que contenía colagenasa (solución II) para el aislamiento de los islotes pancreáticos, como se detalla en el Apartado 2.4.

2.2. Diseño experimental: dietas.

2.2.1. Estudio de obesidad.

En cada uno de los modelos animales incluidos en este estudio (WT y CORT-KO), se establecieron diferentes grupos que fueron alimentados con dieta baja (LFD: low-fat diet) y alta en grasa (HFD: high-fat diet; Research Diets, New Brunswick, EE.UU.). Además se tomó un subgrupo control a los que se les suministró una dieta normal (Standard Chow Diet; LabDiet, Framingham, EE.UU.). Los animales bajo cualquier tipo de dieta tuvieron libre acceso a comida y agua. La composición de estas dietas se detalla en la Tabla 2.

	PROTEINAS	CARBOHIDRATOS	GRASAS
Standard Chow Diet	27%	56%	17%
LFD: low-fat diet	20%	70%	10%
HFD: high-fat diet	20%	20%	60%

Tabla 2.: Composición calórica (Kcal) de proteínas, carbohidratos y grasas de las dietas estándar, LFD y HFD, expresadas en porcentaje.

A un subgrupo de animales WT se les suministró la dieta LFD o HFD a partir de la 12^a semana de vida (etapa adulta) durante 13 semanas. Un segundo subgrupo de animales WT se alimentó con estas dietas a partir la 8^a semana de vida durante 38 semanas. Por último, los animales de genotipos WT y CORT-KO se alimentaron a partir de la 4^a semana (etapa juvenil) durante 16 semanas, como aparece representado en la Fig. 19. El peso de cada animal se controló 2 veces por semana desde el momento del inicio de la dieta hasta el mismo día del sacrificio. Además, durante la semana anterior al sacrificio los animales se inmovilizaron a modo de entrenamiento. Los diferentes subgrupos se sacrificaron a la 20^a semana de edad.

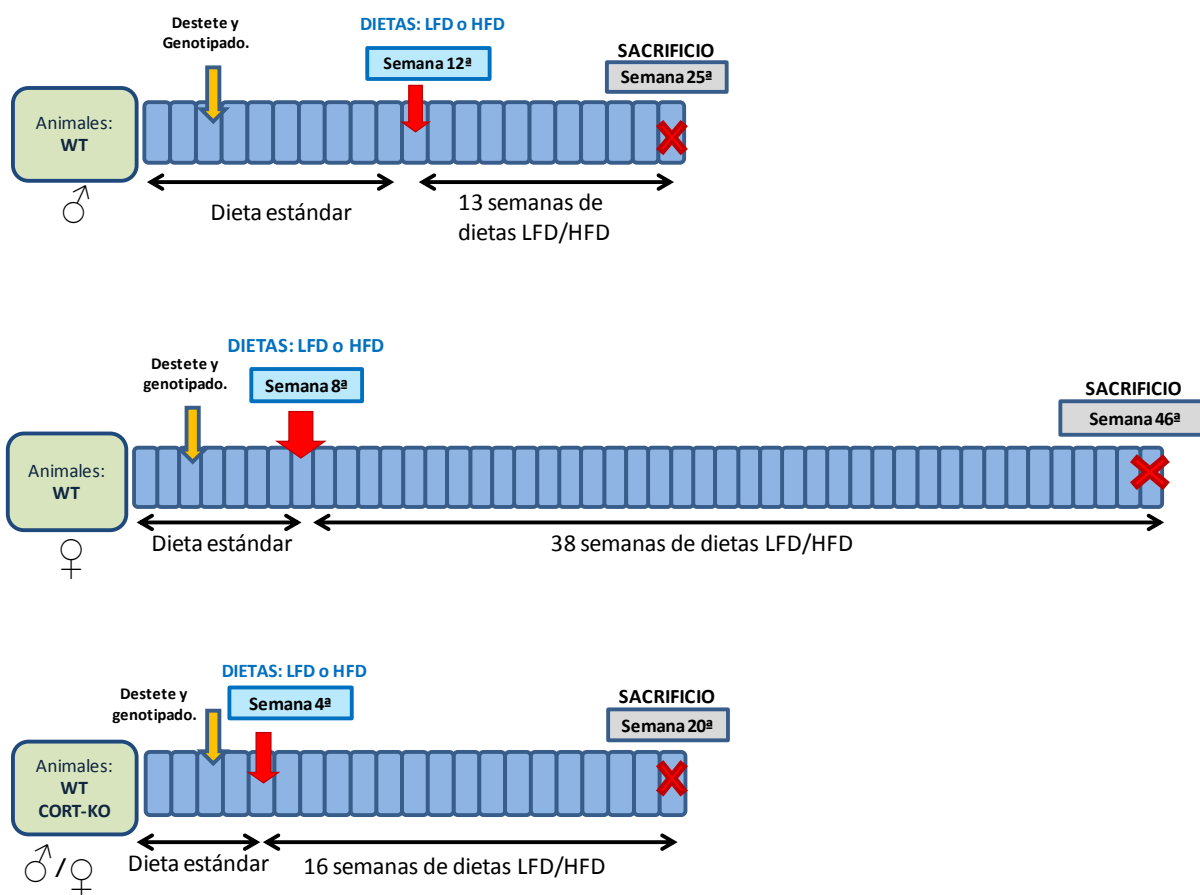


Fig. 19. Diseño experimental del suministro de dietas en el tiempo a los diferentes subgrupos (LFD/HFD: dieta baja/alta en grasa).

2.2.2. Estudio de ayuno.

Además de la condición de obesidad inducida por dieta, también hemos realizado estudios de ayuno sobre los modelos animales WT y CORT-KO, machos y hembras.

Para ello se establecieron tres grupos de ratones macho y hembra con 14 semanas de edad por cada uno de los genotipos. Un subgrupo tuvo libre acceso a comida estándar y agua. Los otros dos subgrupos se alimentaron *ad libitum* hasta 24 o 48 horas antes del día del sacrificio, momento en el que se les retiró el acceso a la comida y manteniendo el libre acceso al agua, causando de esta forma un ayuno prolongado como aparece reflejado en la Fig. 20. Durante la semana anterior al sacrificio, exceptuando las horas en las que se sometieron a ayuno, los animales se inmovilizaron a modo de entrenamiento. El peso de los animales fue controlado justo antes y después del periodo de ayuno.

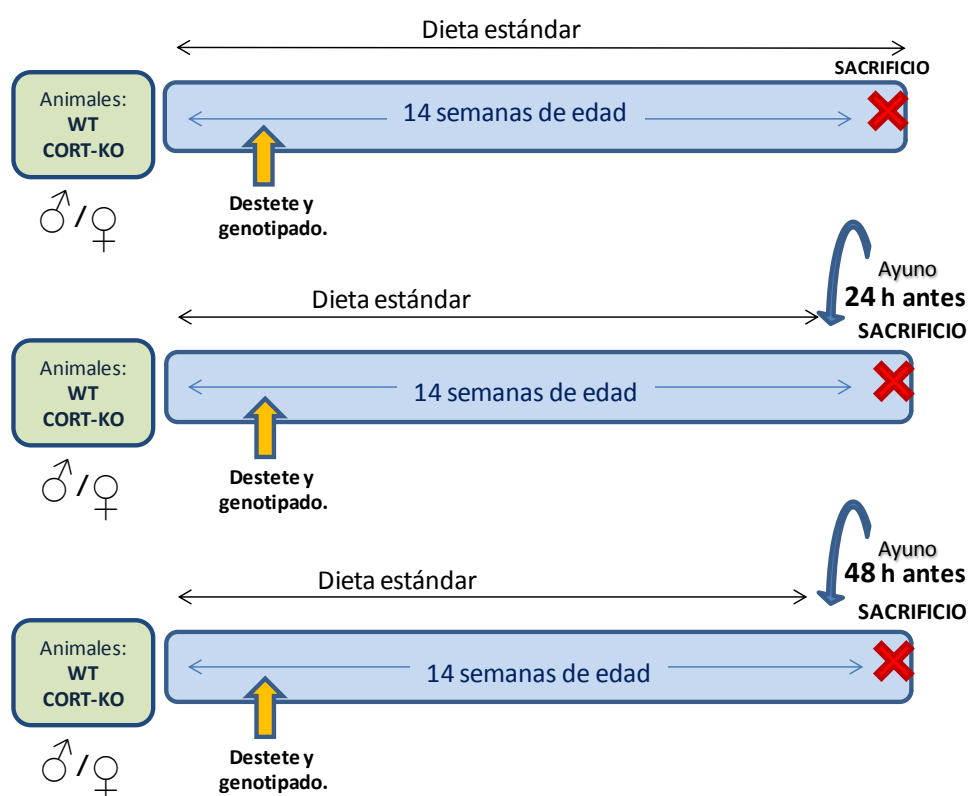


Fig. 20. Diseño experimental de las condiciones de ayuno en los diferentes subgrupos.

2.3. Bombas de cortistatina.

Para analizar el efecto de la CORT exógena sobre ratones carentes de CORT desde el nacimiento se colocaron bombas osmóticas (Alzet, Cupertino, EE.UU.) por vía subcutánea, siguiendo las instrucciones del fabricante, como se ha descrito anteriormente (Córdoba-Chacón *et al.*, 2011c). Se llenó el depósito de la bomba con CORT-14 (Phoenix Pharmaceuticals Inc., Karlsruhe, Alemania), siempre evitando la formación de burbujas. La dosis se bombeó a una concentración de 125 ng/kg/h a una velocidad de infusión constante en ratones hembra de 20 semanas de edad durante un periodo total de 7 días. Durante la semana en que los animales tuvieron colocadas las bombas, éstos fueron alimentados con dieta estándar (Standard Chow Diet). Transcurrido este tiempo las bombas fueron extraídas y los animales sacrificados. Inmediatamente después del sacrificio se extrajo el páncreas y se congeló a -80 °C hasta el momento de su análisis.

2.4. Aislamiento de islotes pancreáticos.

El procedimiento empleado para el aislamiento de islotes pancreáticos es una modificación del descrito por el Dr. Dong-Sheng y colaboradores. Las diferentes soluciones usadas durante este procedimiento se detallan en el Apéndice 1.

Inmediatamente tras la extracción del páncreas (Fig. 21A), éste se sumergió en un tubo Falcon conteniendo 4 ml de solución II y se mantuvo a 4 °C. A continuación, cada muestra se transfirió a una placa de vidrio sobre la que se realizaron cortes hasta obtener fragmentos de páncreas de aproximadamente 1 mm³ (Fig. 21B). Se recogieron con una pipeta Pasteur y se depositaron en un tubo cónico. Seguidamente, se les añadió Solución II fresca y se incubaron a 37 °C en el baño María durante 30 min. Cada 10 min los fragmentos se hicieron pasar suavemente a través de la pipeta Pasteur con objeto de aumentar la eficiencia del aislamiento (Fig. 21C). Tras esta incubación, los fragmentos se centrifugaron a 800 rpm a 4 °C durante 2 min y después se retiró el sobrenadante. Al pellet resultante se le añadió 5 ml de solución IV, en la que se incubaron durante 10 min a 37 °C y a continuación se añadieron 20 ml de Solución I (4 °C) en la que se resuspendió muy despacio con la pipeta Pasteur. A continuación, se centrifugó a 800 rpm a 4 °C durante 2 min, se eliminó el sobrenadante y se procedió a los lavados de los islotes con 15, 10 y 5 ml de Solución I a 4 °C.

La suspensión de islotes se filtró a través de un filtro de nailon de 70 µm (BD Biosciences, Erembodegem, Bélgica) en el que los islotes quedaron retenidos (Fig. 21D). A continuación se recogieron invirtiendo el filtro sobre una placa para cultivo de tejido (60 x 15 mm) y haciendo

pasar a través de la misma Solución III. Se recogieron los islotes volcando el filtro y haciendo pasar por la cara opuesta a los islotes 5ml de Solución III atemperada. Los islotes se recogieron en dichas placas para cultivo de tejido (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania) y se incubaron a 37 °C (Fig. 21E). Finalmente, tras unas horas atemperados, se comprobó la morfología y el número de islotes con ayuda de un microscopio óptico invertido y mediante una tinción con ditizona (Fig. 21F), como se indicará en el Apartado 2.5.2.

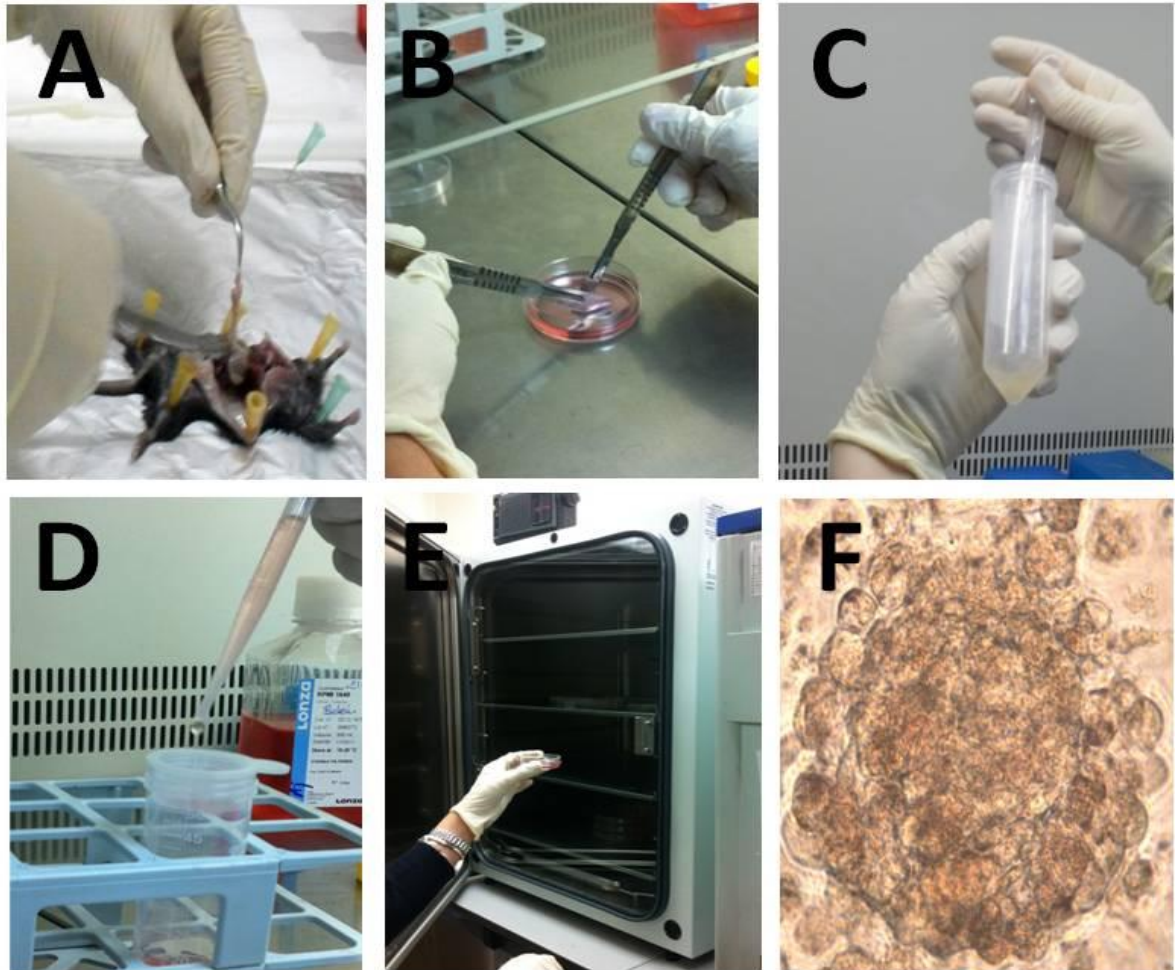


Fig. 21. Ilustración del procedimiento para el aislamiento de islotes pancreáticos a partir del páncreas total de ratón.

2.5. Cultivo de islotes.

2.5.1. Condiciones de cultivo.

Tras su aislamiento, los islotes pancreáticos se cultivaron a 37 °C (95 % de humedad relativa y con niveles de CO₂ al 5%) durante 72h en Solución III. A continuación, se recogieron mediante centrifugación a 800 rpm a 4 °C durante 3 min y se transfirieron a placas de cultivo específicas para cultivo en suspensión (Sarstedt) en las que se mantuvieron durante 7 días realizando un cambio de medio cada 48h.

2.5.2. Pureza de islotes.

Para verificar la pureza del cultivo de islotes se usó la tinción con difeniltiocarbazona o ditizona (DTZ) (Sigma-Aldrich Corp.). Previamente se disolvieron 50 mg DTZ en 5 ml DMSO (1% p/v), se diluyó 1/20 en HBSS y se hizo pasar a través de filtros de nailon de 40 µM (BD Biosciences, Erembodegem, Bélgica). La DTZ se une a los iones zinc presentes en los gránulos secretores de las células beta, tiñendo de rojo el islote pancreático, facilitando de este modo su identificación y viabilidad. Para ello se pusieron sobre una placa de Petri 50 µl de islotes en suspensión, 50 µl de DTZ a 4 °C y 100 µl de HBSS en un microscopio óptico invertido y se identificó y contabilizó la proporción de islotes de color rojizo con respecto a los demás islotes. Este proceso se realizó justo después del proceso de aislamiento, así como pasadas las primeras 72 h en el incubador de cultivo (Cultex, Madrid, España) e inmediatamente antes de realizar cualquier experimento con islotes, controlando así la pureza del cultivo. Además, mediante esta técnica confirmamos que la viabilidad antes de su uso en experimentación fue siempre superior al 80%.

2.5.3. Tratamientos experimentales sobre islotes pancreáticos en cultivo.

Tras 10 días de cultivo se unió el material procedente de distintos animales que pertenecían al mismo grupo y género, se recogieron los islotes mediante centrifugación a 800 rpm y se pesaron determinando así la cantidad total (mg) de islotes en cada caso. A continuación se distribuyeron 50 mg en placas de cultivo (Thermo Fisher Scientific) en un volumen final de 2 ml de medio CMLR-1066 (Invitrogen). Posteriormente, estas placas se incubaron en presencia de CORT-14 10nM (Phoenix Pharmaceuticals Inc.) durante un periodo de 24h a 37°. Transcurrido este tiempo se recogieron por un lado los islotes para su procesado de aislamiento de ARN.

3. Estudio morfológico del páncreas.

3.1. Inclusión en parafina.

Tras su extracción, el páncreas se lavó en PBS para limpiar restos de sangre y se fijó inmediatamente en paraformaldehído al 4% en PBS durante 12-16 horas a temperatura ambiente. A continuación, las muestras se lavaron repetidas veces y se procesaron para su inclusión en parafina como se detalla en el Apéndice 2. Finalmente, se realizaron cortes de 5 μm de grosor y se colocaron en portaobjetos para analizarlos bajo el microscopio óptico.

3.2. Tinción con hematoxilina-eosina.

Los cortes de páncreas se tiñeron con hematoxilina-eosina según el protocolo indicado en el Apéndice 3.

3.3. Inmunohistoquímica.

Con el fin de estudiar la localización de las células productoras de insulina y glucagón en los islotes pancreáticos se realizaron estudios de inmunofluorescencia a partir de los cortes de parafina de los páncreas de los animales WT y CORT-KO obesos y bajo condiciones metabólicas normales. El protocolo seguido se indica en el Apéndice 4.

4. Técnicas de biología molecular.

4.1. Aislamiento de ARN.

Para el aislamiento del ARN pancreático, éste se colocó inmediatamente después de su extracción en un criotubo al que se le añadió 1 ml de *Trizol Reagent* (Invitrogen) y se homogeneizó con una ultraturrax (IKA, Staufen, Alemania). A continuación, cada criotubo se introdujo en nitrógeno líquido para permitir una rápida congelación del homogenado y, una vez en el laboratorio, se almacenaron a -80 °C. Para el aislamiento del ARN, se descongelaron las muestras siguiendo las instrucciones del fabricante del reactivo Trizol. Así, se les añadió 200 µl de cloroformo que se mezcló con el resto de la muestra por inversión durante 15 s. Tras 2-3 min se centrifugó a 12000 rpm a 4 °C durante 15 min. A continuación, se transfirió la fase acuosa resultante a un nuevo tubo y se añadió 500 µl de isopropanol para permitir la precipitación del ARN. Tras una nueva centrifugación a 12000 rpm a 4 °C durante 10 min se procedió a lavar la pella de ARN con etanol al 75%, seguido de una última centrifugación, a partir de la cual se obtuvo la pella correspondiente al ARN total. Este ARN se resuspendió en DEPC-H₂O, y se cuantificó en un NanoDrop obteniéndose valores comprendidos entre 1,7 y 2,0 en la relación 260/280 nm, indicativo de la integridad del ARN.

Una vez conocida la concentración de ARN en cada tubo, se tomaron 7 µg de ARN total que fueron tratados con 1 U/µg de DNAsa (Promega, Madrid, España) con objeto de eliminar posibles trazas de DNA genómico. Así, cada 7 µg de ARN se trataron con 1 µl de buffer 10x, 1 µl de la enzima DNAsa y completando con agua DEPC hasta un volumen de 10 µl. Seguidamente se incubó a 37 °C durante 30 min, reacción que se detuvo añadiendo 1 µl del DNAsa Stop Buffer y se incubaron 10 min a 70 °C. A continuación, se procedió a la precipitación del ARN y para ello se añadieron 250 µl de agua DEPC, 1 µl de glucógeno (Roche, Barcelona, España) y 250 µl de isopropanol, se centrifugó durante 10 min, seguido de lavados con etanol al 75%. Al eliminar el sobrenadante se obtiene el ARN (libre de DNA), que se resuspendió en 11 µl de agua DEPC y nuevamente se comprobó tanto la integridad del ARN como su concentración.

4.1.1. Aislamiento de ARN a través de columna.

Este método se utilizó para el aislamiento de ARN de islotes pancreáticos en cultivo. Para ello, se utilizó el kit Absolutely ARN Miniprep (Stratagene, La Jolla, EE.UU.), y en este caso, cada 50 mg de islotes se homogeneizaron en 300 µl de lisis buffer conteniendo 1,75 µl de B-mercaptoetanol con ayuda de un homogeneizador de vidrio (Thermo Fisher Scientific). El

homogenado resultante se transfirió a una columna Prefilter Spin Cup y se centrifugó a máxima velocidad durante 1 min. Se repitió el proceso con 150 µl de buffer de Lisis extra y un posterior centrifugado de 2 min a máxima velocidad. Al volumen resultante se le añadió 450 µl de Etanol al 70 % a 4 °C. Posteriormente, todo el volumen se transfirió al ARN Binding Cup, y tras un centrifugado de 1 min a máxima velocidad, quedó el ARN retenido en el filtro de la columna.

El tratamiento con DNAsa se inició pasando 600 µl de Low Salt 1x Buffer por el filtro de la columna que contenía el ARN, mediante un centrifugado de 1 min, seguido de otro centrifugado de 2 min para secar el filtro. A continuación se incubó a 37 °C con 50 µl de DNAsa sobre el filtro de la columna. Transcurridos 30 min se añadió 600 µl de High Salt Buffer sobre el centro de la columna y se centrifugó 1 min. Para lavar el filtro que contenía el ARN se añadieron 600 y 300 µl de Low Salt Buffer y seguidamente se realizaron dos centrifugaciones de 1 y 2 min respectivamente. Finalmente se pasó la columna a un tubo limpio y se incubó durante 2 min con Elution Buffer a 65 °C, y tras eluir el ARN, se cuantificó mediante un NanoDrop de manera similar a la descrita en el apartado anterior, almacenándose la muestra a -80 °C hasta la realización de la retrotranscripción.

4.2. Retrotranscripción (RT).

Para ello, se emplearon 4 µg de ARN libre de ADN usando el kit comercial de RT (Fermentas) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Así, al ARN se le añadieron 4 µl del buffer de reacción, 1 µl de la enzima RiboLock y 2 µl de una mezcla de dNTPs a una concentración 10 mM. Tras una incubación de 8 min a 25 °C, se añadió 2 µl de la transcriptasa inversa. A continuación, se incubaron las muestras a 25 °C durante 10 min, seguida de otra incubación a 37 °C durante 60 min y por último, una incubación de 10 min a 70 °C para detener la reacción. Tras estas sucesivas incubaciones las muestras se dejaron enfriar en hielo. El volumen final obtenido fue de 20 µl a una concentración de 100 µg de cDNA/µl aproximadamente, asumiendo una eficiencia de RT de 100 %. Las muestras se almacenaron a -20 °C hasta el momento de su análisis mediante PCR cuantitativa a tiempo real.

4.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Durante el presente trabajo se han llevado a cabo determinaciones mediante PCR convencional y PCR cuantitativa a tiempo real, con objeto de evaluar la expresión de diversos genes en el páncreas total y/o endocrino de ratones de los genotipos WT y CORT-KO.

4.3.1. PCR convencional.

Por cada reacción se utilizó 1 µl (100 ng) de cDNA de cada muestra. Al molde se le añadió una mezcla compuesta por 12,5 µl de Máster Mix (Fermentas), 9,5 µl de agua destilada, 1 µl de *primer sense* (10 µM) y 1 µl de *primer antisense* (10 µM), obteniendo finalmente un volumen final de reacción de 25 µl. El perfil de temperatura fue el siguiente: un ciclo inicial de 95 °C durante 5 min, seguido de 40 ciclos de 95 °C durante 30 s, 61 °C durante 30 s y 72 °C durante 30 s, y un ciclo final de 72 °C durante 5 min. Para la electroforesis de los productos de PCR se preparó un gel al 2 % de agarosa con 0,05 µl/ml de bromuro de etidio, por donde se hizo pasar a las muestras a 60-70 V durante 45 min aproximadamente.

4.3.2. Diseño de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos específicos de los genes a estudiar fueron diseñados a partir de secuencias de ratón conocidas y publicadas en la base de datos Genbank NCBI (National Center of Biotechnology Information). En la Tabla 3 se indican los números de acceso junto con las correspondientes secuencias sentido y antisentido diseñadas para cada transcrito. El diseño se realizó mediante el uso del software Primer3, el cual nos permitió calcular determinados parámetros y, en la medida de lo posible, determinar unos criterios a seguir, como:

- 1) el tamaño de los oligonucleótidos entre 19 y 21 pb,
- 2) la proporción en guaninas y citosinas no excediera el 55 %,
- 3) la unión a distintos exones, en la medida de lo posible, con el propósito de evitar ampliaciones inespecíficas de DNA genómico,
- 4) la temperatura de fusión o de melting (T_m) óptima fuera $61 \pm 0,2$ °C,
- 5) la amplitud del producto entre 50 y 225 pb,
- 6) no formen estructuras secundarias (oligonucleótidos con secuencias auto-complementarias) o dímeros (secuencias terminales 3' complementarias).

Seguidamente, y con el fin de verificar la especificidad de cada pareja de oligonucleótidos diseñados, se procedió a la secuenciación de sus productos. Para ello, se amplificaron los distintos productos mediante PCR, y tras observar el tamaño esperado en un gel de agarosa para cada uno de ellos, se purificaron mediante el kit Gel Purification Accuprep (Bioneer, Seoul, Korea). Posteriormente, se cuantificaron a través del nanodrop y se secuenciaron 20 ng/100 pb de cada producto en el Servicio Central de Apoyo a la Investigación (S.C.A.I.) de la Universidad de Córdoba.

Material y métodos

Primer	Tamaño	Secuencias	Nº acceso
SISTEMA SOMATOSTATINA/CORTISTATINA			
SST	113 pb	Sentido: TCTGCATCGTCCTGGCTTT	NM_009215.1
		Antisentido: CTTGGCCAGTTCCTGTTTCC	
Sstr1	135 pb	Sentido: TGCCCTTTCTGGTCACTTCC	NM_009216
		Antisentido: AGCGGTCCACACTAAGCACACA	
Sstr2	105 pb	Sentido: TGATCCTCACCTATGCCAACA	NM_009217.2
		Antisentido: CTGCCTTGACCAAGCAAAGA	
Sstr3	139 pb	Sentido: GCCTTCTTCGGCCTCTACTT	NM_009218.3
		Antisentido: GAATGCGACGTGATGGTCTT	
Sstr4	121 pb	Sentido: AGGCTCGTGCTAATGGTGGT	NM_009219.3
		Antisentido: GGATGAGGGACACATGGTTG	
Sstr5	105 pb	Sentido: ACCCCCTGCTCTATGGCTTT	NM_011425.2
		Antisentido: GCTCTATGGCATCTGCATCCT	
Sst5 TMD1	152 pb	Sentido: AACGTGTATATCCAGACAAGAGTGG	GQ359777
		Antisentido: TCCCAGAAGACAACACCACA	
Sst5 TMD2	132 pb	Sentido: CAGTTCACCCGTA CTGTGGCAT	GQ359776
		Antisentido: CACAGCTTCAGGGTGGGTAA	
Sst5 TMD4	131 pb	Sentido: GTCCACCCTCTCCGCTCA	GQ359775
		Antisentido: GCAGGTTCCGAGAGGACATC	
CORT	213 pb	Sentido: AAGAGACCCTCGTCCACCAA	NM_117745
		Antisentido: ACCAGGCAAGGAAAGTCAGAAAG	
SISTEMA GHRELINA			
GHRELINA	126 pb	Sentido: TCCAAGAAGCCACCAGCTAA	NM_021488.4
		Antisentido: AACATCGAAGGGAGCATTGA	
GOAT	120 pb	Sentido: ATTTGTGAAGGGAAGGTGGAG	NM_001126
		Antisentido: CAGGAGAGCAGGGA AAAAGAG	
GHS-R 1a	71 pb	Sentido: TCAGGGACCAGAACCACAAA	NM_177330.3
		Antisentido: CCAGCAGAGGATGAAAGCAA	
INTRON 2	226 pb	Sentido: GCTGTCTTCAGGCACCATCT	DQ_993169
		Antisentido: GTGGCTTCTGGATTCCCTTTC	
INSULINA Y GLUCAGÓN			
Insulina 1	164 pb	Sentido: TAATGGGCCAAAACAGCAAAG	NM_008386.3
		Antisentido: GGGTAGGAAAGTGCACCAACA	
Insulina 2	158 pb	Sentido: TCAAAAACCATCAGCAAGCA	NM_001185048
		Antisentido: ACCAGGTGGGAACCAAAA	
Receptor insulina	129 pb	Sentido: TCATGGATGGAGGCTATCTGG	NM_010568.2
		Antisentido: CCTTGAGCAGGTTGACGATTT	
Glucagón	108 pb	Sentido: ACTCACAGGGCACATTCACC	NM_008100.3
		Antisentido: CAATGTTGTTCCGGTTCCTC	
HOUSEKEEPING GENES			
GADPH	104 pb	Sentido: ATGGCCTTCCGTGTTCTCTAC	XM_001473623.1
		Antisentido: GCCTGCTTCAACCXCCTTCTT	
B-actina	205 pb	Sentido: CTGGGACGACATGGAGAAAG	NM_007393.2
		Antisentido: ACCAGAGGCATACAGGGACA	
Ciclofilina A	109 pb	Sentido: CAAGACGGAGTGGTTGGATG	NM_008907.1
		Antisentido: TGCCACAGTCGGAAATGGT	

Tabla 3. Tamaño, secuencias sentido y antisentido y número de acceso de oligonucleótidos específicos de ratón para la reacción de PCR convencional o qRT-PCR.

4.3.3. Construcción de curvas estándar.

Las curvas estándar usadas para la cuantificación absoluta de los genes de los diferentes componentes de los sistemas SST/CORT y ghrelina se obtuvieron mediante amplificación de los mismos usando los oligonucleótidos detallados en la Tabla 3, a partir de muestras donde la expresión de los distintos genes fue abundante.

Los productos amplificados se verificaron por secuenciación. Posteriormente, se cuantificó y calculó para cada gen un número de copias stock (10^6 copias) a partir del cual se realizaron diluciones seriadas en proporción 1:10 que formarían los distintos puntos de la curva estándar. Así, cada curva estaba constituida por 7 puntos: 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 y 10^0 copias de transcrito.

4.3.4. PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR).

Por cada reacción se utilizó 1 μ l (100 ng) de cDNA al que se añadieron 10 μ l de Master Mix (Stratagene), 8,25 μ l de agua destilada, 0,375 μ l de *primer sense* (10 μ M) y 0,375 μ l de *primer antisense* (10 μ M), resultando un volumen final de 20 μ l. El perfil de temperatura usado fue de 94 °C durante 5 min, seguido de 40 ciclos de 94 °C 30 s, 61 °C 30 s y 72 °C 30 s y para finalizar, un ciclo de 72 °C durante 5 min, llevándose a cabo en un iCycler IQ™ (Bio Rad, Barcelona, España).

Además de los genes objeto de estudio, se midieron tres genes que se expresan constitutivamente, GADPH, β actina y Ciclofilina A, denominados *housekeeping* (Tabla 3). Los valores obtenidos a partir estos genes se estudiaron mediante el software Genorm 3.3. (Vandesompele et al., 2002) que genera un factor de normalización (FN) para cada muestra, que sirvió de referencia para la expresión del resto de genes.

5. Análisis estadístico.

Los resultados presentados en esta Tesis están expresados como la media \pm error estándar de la media (SEM). El número de muestras usadas para cada experimento se especifica en cada caso. Las diferencias significativas se determinaron mediante el test *t-Student* para comparar los grupos de ratones correspondientes a los genotipos WT y CORT-KO con el programa estadístico GraphPad Prism 5.0 (*GraphPad Software Inc.*, San Diego, CA, EE.UU.). Los resultados se consideraron significativos para valores de $p < 0,05$.

6. Apéndices.

6.1. **Apéndice 1. Listado de kits y reactivos utilizados.**

Para la ejecución de los experimentos de esta Tesis y su posterior análisis se adquirieron los, materiales, reactivos y programas de las siguientes compañías:

- **Bioneer** (Seul, Korea): Kit Gel purification Accuprep.
- **Invitrogen** (Barcelona, España): Fungizona, Glutamax, Trizol Reagent, Proteinasa K, Insulina/transferrina/selenio (ITS), Penicilina/estreptomicina (P/S), medios de cultivo CMLR-1066, RPMI 1640 y Solución de Hank's (HBSS).
- **Millipore** (Madrid, España): Kit Elisa de ghrelina acilada de ratón, Kit Elisa de ghrelina total de ratón, Kit Elisa de insulina de ratón.
- **Fermentas** (Hanover, EE.UU.): Kit de RT: RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit, Master Mix para PCR convencional.
- **Jackson ImmunoResearch** (West Grove, EE.UU.): Anticuerpos secundarios anti-insulina y anti-glucagón.
- **Phoenix Pharmaceuticals Inc.** (Karlsruhe, Alemania): CORT-14 de ratón/rata, Kit Elisa de glucagón de ratón, Kit Elisa de SST de ratón.
- **Promega** (Madrid, España): Kit de tratamiento con DNAsa.
- **Roche** (Barcelona, España): Inhibidor de proteasas MiniProtease Inhibitor, Glucógeno.
- **Sera-Lab LTD** (Crawley Down, Reino Unido): suero fetal bovino (FBS).
- **Sigma-Aldrich Corp.** (St. Louis, EE.UU.): Colagenasa tipo V, gentamicina, toxina colérica, isopropanol, DNAsa Desoxirribonucleasa I de páncreas bovino, anticuerpos primarios anti-insulina y anti-glucagón.
- **Stratagene** (La Jolla, EE.UU.): Absolutely RNA RT-PCR Miniprep Kit, Master Mix para qRT-PCR (IQ SYBR Green).

6.2. **Apéndice 2. Preparación de medios para el aislamiento de islotes.**

Para llevar a cabo el protocolo de aislamiento de los islotes de Langerhans a partir del páncreas total del ratón, fue necesaria la preparación de diferentes medios y su posterior mantenimiento a 4 °C hasta su uso. Los medios usados en este proceso fueron los siguientes:

- **SOLUCIÓN I:** solución de Hank's complementada con CaCl₂ (HBSS; Invitrogen).
- **SOLUCIÓN II:** constituida por 1 mg/ml de colagenasa tipo V (Sigma-Aldrich Corp.) por cada 5ml de HBSS.

- **SOLUCIÓN III:** constituida por medio RPMI 1640 (Invitrogen) suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10 % (Sera-Lab LTD, Crawley Down, Reino Unido), 5 ml de glutamax 200 mM (Invitrogen), 10000 units/ml de penicilina/estreptomicina (1:100) (Invitrogen) y 50 ng/μl de gentamicina (1:200) (Sigma-Aldrich Corp.) por cada 500 ml de RPMI 1640.
- **SOLUCIÓN IV:** constituida por 100 ng/μl de DNAsa en 5 ml de HBSS (Deoxiribonucleasa I de páncreas bovino, Sigma-Aldrich Corp).
- **SOLUCIÓN V:** constituida por medio CMLR-1066 (Invitrogen) suplementado con FBS al 10 %, 5 ml de glutamax 200 mM, 3 ml de Fungizona a 250 μg/ml (Invitrogen), 20 μl de toxina colérica a 100 ng/ml (Sigma-Aldrich Corp.), 5 ml de Insulina (10 μg/ml), Transferrina (5,5 μg/ml), Selenio (6,7 ng/ml) (ITS) (Invitrogen), penicilina/estreptomicina a 10.000 U/ml (1:100) (Invitrogen), gentamicina a 50 ng/μl (1:200), por cada 500 ml de medio.

6.3. Apéndice 3. Protocolo de inclusión en parafina.

Para la inclusión de las muestras en parafina fueron necesarios los siguientes pasos:

- Fijar las muestras en paraformaldehído al 4% durante 12-16 horas a temperatura ambiente.
- Lavar 3 veces (15 min/lavado) con PBS 1x.
- Deshidratar con distintos alcoholes a temperatura ambiente:
 - o Alcohol 70 % durante 1 hora.
 - o Alcohol 90 % durante 1 hora.
 - o Alcohol 100 % durante 1 hora. Repetir 2 veces.
- Sumergir en xilol a temperatura ambiente durante 30 minutos. Repetir 2 veces.
- Sumergir en xilol-parafina (al 50 %) a 60 °C durante 1 hora.
- Sumergir en parafina I a 60 °C durante 1 hora.
- Sumergir en parafina II a 60 °C durante 1 hora.
- Sumergir en parafina III a 60 °C durante 1 hora.
- Hacer bloques de parafina y dejar solidificar a -20 °C.
- Obtener secciones de 5 μm de grosor y colocar sobre el portaobjetos.

6.4. Apéndice 4. Protocolo de tinción con hematoxilina-eosina.

Los pasos a seguir para la teñir las muestras colocadas en los cubreobjetos con hematoxilina-eosina son los siguientes:

- Desparafinar con xilol durante 15 minutos.

- Hidratar:
 - Alcohol 100 % durante 5 minutos.
 - Alcohol 90 % durante 5 minutos.
 - Alcohol 70 % durante 5 minutos.
- Lavar con agua corriente durante 5 minutos.
- Teñir con hematoxilina durante 20 minutos.
- Lavar con agua corriente durante 15 minutos.
- Teñir con eosina durante 5 minutos.
- Lavar con agua corriente.
- Deshidratar:
 - Alcohol 70 % durante 5 minutos
 - Alcohol 90 % durante 5 minutos.
 - Alcohol 100 % durante 5 minutos.
 - Xilol.
- Montar permanentemente.

6.5. Apéndice 5. Protocolo de inmunohistoquímica.

- Desparafinar e hidratar la muestra.
- Lavar 3 veces con PBS 1x (5 min).
- Bloquear con BSA al 1 % en PBS durante 1h a temperatura ambiente.
- Incubar con el anticuerpo primario durante toda la noche en cámara húmeda. Los anticuerpos se diluyeron en PBS a la siguiente concentración:
 - Anti-insulina de cobaya 1:2000 (Sigma-Aldrich Corp.).
 - Anti-glucagón de ratón 1:8000 (Sigma-Aldrich Corp.).
- Lavar 3 veces con PBS 1x (5min).
- Incubar con el anticuerpo secundario (Jackson ImmunoResearch) correspondiente durante 1 hora a temperatura ambiente. Se diluyeron en PBS a una concentración 1:300.
- Lavar 3 veces con PBS 1x (5 min).
- Incubar a 4 °C durante 10 minutos con Hoechst para teñir los núcleos de azul.
- Lavar 2 veces con PBS 1x (5 min).
- Montar mezclando el medio de montaje (Glicerol) en PBS 1x (1:1).

Resultados

2. Estudio morfológico del páncreas de ratones WT y CORT-KO.

Tras la extracción del páncreas, éste se procesó para su observación al microscopio óptico. A continuación se realizó un análisis morfológico sobre secciones de páncreas sometidas a tinción con hematoxilina-eosina (H&E) e inmunotinción.

1.1. Tinción con hematoxilina-eosina.

Las secciones de páncreas teñidas con H&E se observaron al microscopio óptico con un objetivo de 20x y sobre ellas se tomaron fotografías. El análisis de las imágenes obtenidas no reveló diferencias significativas en la morfología del páncreas en secciones obtenidas de animales WT en comparación a las obtenidas de animales CORT-KO, para ambos géneros. Así, el páncreas mostró su estructura típica organizada en una porción exocrina (acinos pancreáticos) distribuida sobre la mayor parte de la preparación, y la porción endocrina (islotos de Langerhans) distribuida de forma dispersa entre los acinos (Fig. 23).

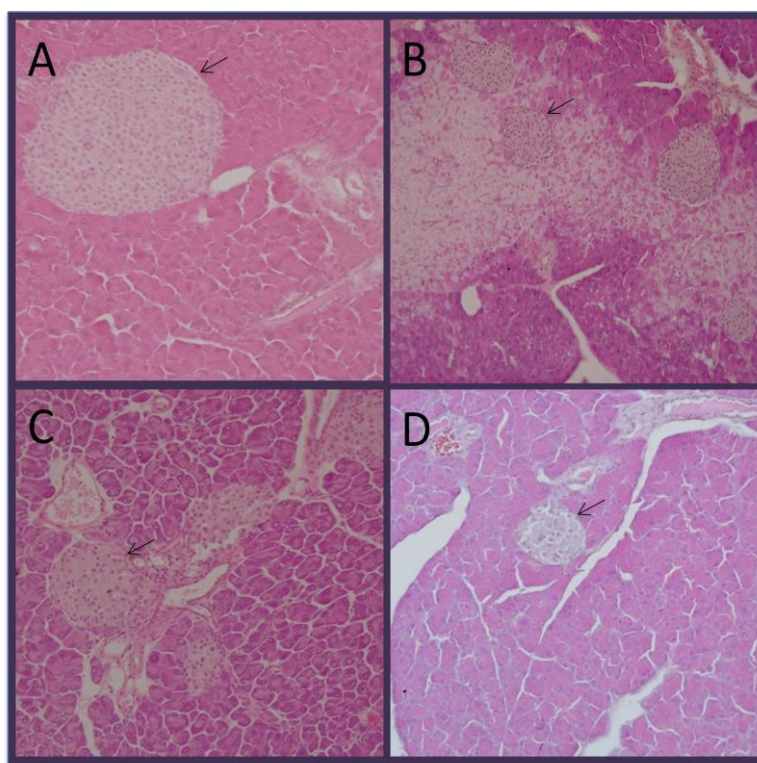


Fig. 23. Imagen representativa de secciones pancreáticas de ratón teñidas con H&E. A) Ratón WT hembra B) Ratón CORT-KO hembra; C) Ratón WT macho; D) Ratón CORT-KO macho. Las imágenes se tomaron con un objetivo de 20x.

1.2. Inmunohistoquímica.

Con objeto de estudiar posibles diferencias en la composición y/o distribución celular en el islote pancreático de animales WT o CORT-KO, se procedió a la inmunodetección de insulina y glucagón. Como puede observarse en la Fig. 24, las células productoras de insulina o beta pancreáticas (verde) se dispusieron en la parte central del islote mientras que las células productoras de glucagón o células alfa (rojo) se localizaron en regiones periféricas del mismo, tanto en secciones obtenidas del páncreas de animales WT como de CORT-KO, y para ambos géneros (Fig. 24).

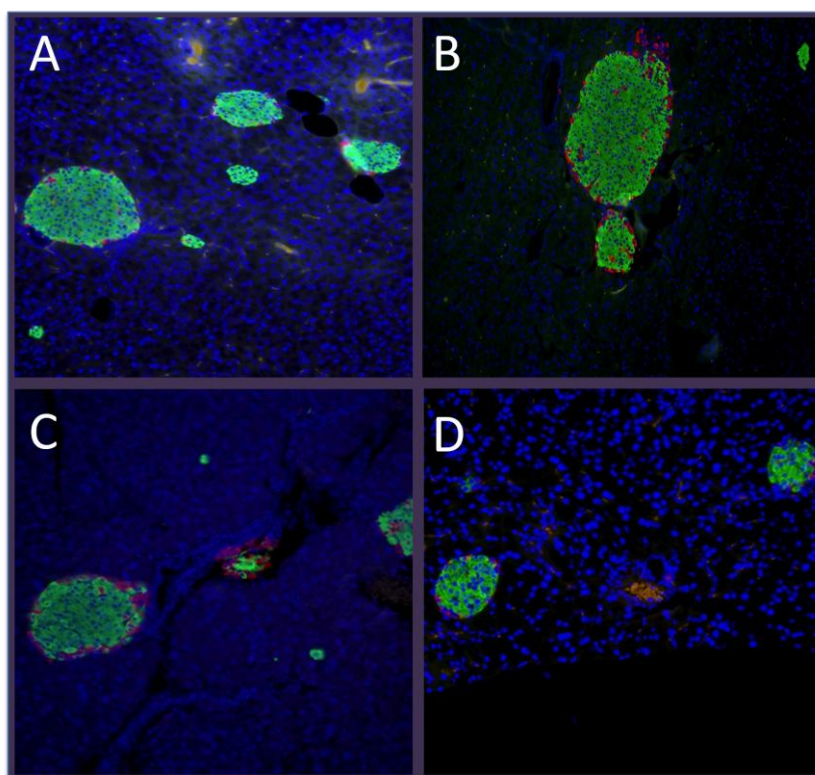


Fig. 24. Imagen representativa de la distribución de células procedentes de insulina (verde) y glucagón (rojo) en secciones de páncreas de ratón. A) Ratón WT hembra B) Ratón CORT-KO hembra; C) Ratón WT macho; D) Ratón CORT-KO macho. Las imágenes se tomaron con un objetivo de 20x. El núcleo celular aparece marcado en azul mediante el uso de Hoechst.

3. Perfil básico de la expresión de los componentes de los sistemas SST/CORT y ghrelina en el páncreas de ratones WT y CORT-KO.

Para ello, se comprobó la presencia de mRNA de la SST/CORT, ghrelina, sus receptores y nuevas variantes en el páncreas de ratones macho y hembra de los genotipos objeto de estudio.

2.1. Sistema SST/CORT.

El análisis de la expresión de los diferentes componentes del sistema SST/CORT se realizó en el páncreas de ratones de ambos sexos con genotipos WT y CORT-KO. Mediante el uso de oligonucleótidos específicos para cada uno de los genes objeto de estudio y PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR), se comprobó la ausencia de CORT en el páncreas de ratones WT y CORT-KO de ambos sexos.

En el caso del páncreas de ratones WT macho se observó la presencia de SST y de sus receptores sst2, sst3 y sst4, siendo la expresión del receptor sst2 significativamente mayor que sst4 y sst3 (Fig.25). La ausencia de CORT endógena en los animales, resultó en una disminución significativa del número de transcritos de SST con respecto al genotipo silvestre, mientras que el nivel de expresión de los receptores sst2, sst3 y sst4 permaneció invariable (Fig.25). Por lo que respecta a la expresión de los transcritos de sst1 y sst5 no se observó expresión significativa de los mismos, permaneciendo ésta por debajo del límite de sensibilidad de la técnica usada.

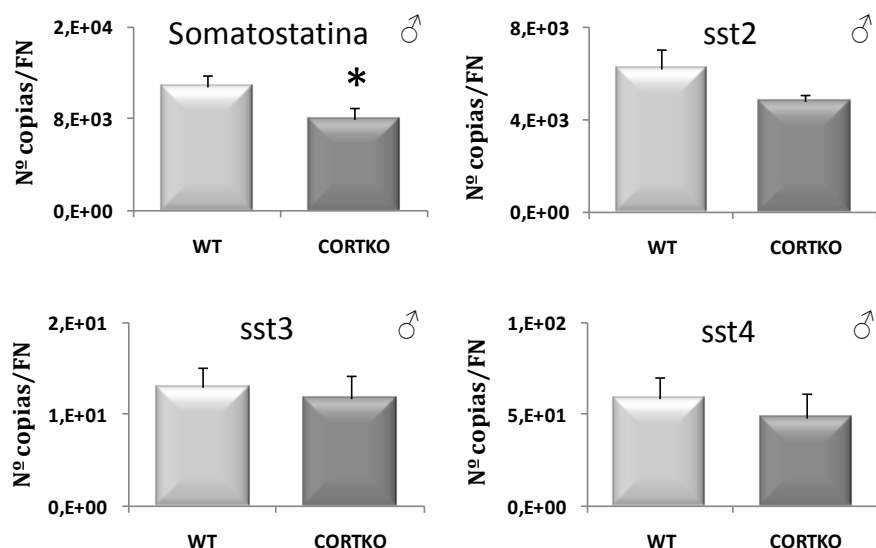


Fig. 25. Nivel de expresión de los componentes del sistema SST en el páncreas de ratones WT y CORT-KO macho determinados mediante qRT-PCR. Los datos representan la media de 5 animales por grupo \pm SEM, expresados como nº de copias/FN (Factor de Normalización) (*: $p < 0,05$ vs WT).

En el páncreas de ratones WT y CORT-KO hembra se comprobó la expresión de los mismos transcritos descritos en el páncreas de ratones WT macho, si bien su número fue variable (Fig. 26). Así, se comprobó que la expresión de sst2 aumentó significativamente mientras que la del resto de los componentes del sistema permaneció invariable.

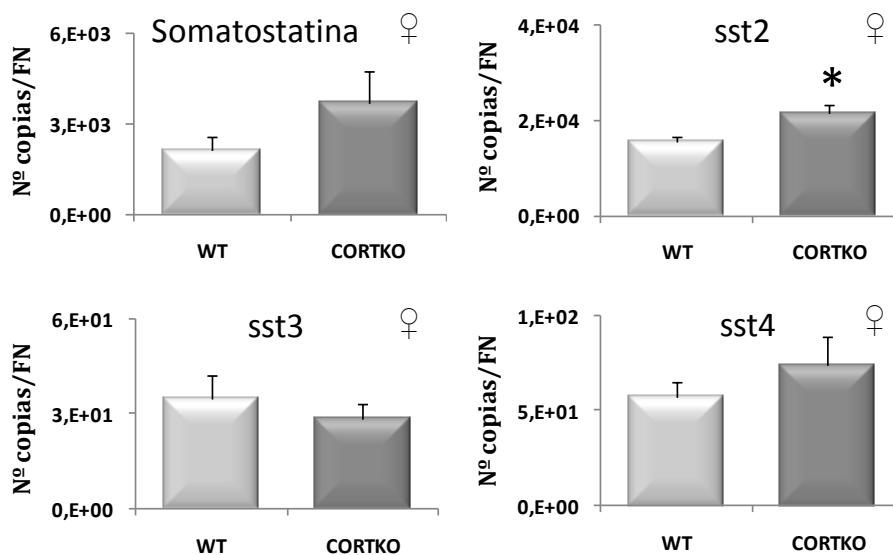


Fig. 26. Expresión de SST, sst2, sst3 y sst4 en el páncreas de ratones WT y CORT-KO hembra determinados mediante qRT-PCR. Los datos representan la media de 5 animales por grupo \pm SEM, expresados como nº de copias/FN (Factor de Normalización) (*: $p < 0,05$ vs WT).

2.2. Sistema ghrelina.

El estudio de la expresión del sistema ghrelina demostró la presencia de transcritos de los diferentes componentes de este sistema en el páncreas de animales de ambos genotipos (WT y CORT-KO) y sexos. En particular, en el páncreas de animales WT macho, se detectó la expresión de ghrelina y su variante truncada In1 ghrelina, siendo la expresión de esta última 3 veces mayor a la observada para la propia de ghrelina (Fig. 27). Estos mismos transcritos mantuvieron una expresión similar en el páncreas de ratones CORT-KO macho (Fig. 27). Igualmente, también se comprobó que el receptor de ghrelina, GHS-R, y la enzima encargada de la modificación de la ghrelina, GOAT, se expresaron a nivel pancreático, viéndose dicha expresión significativamente reducida en animales CORT-KO macho (Fig. 27).

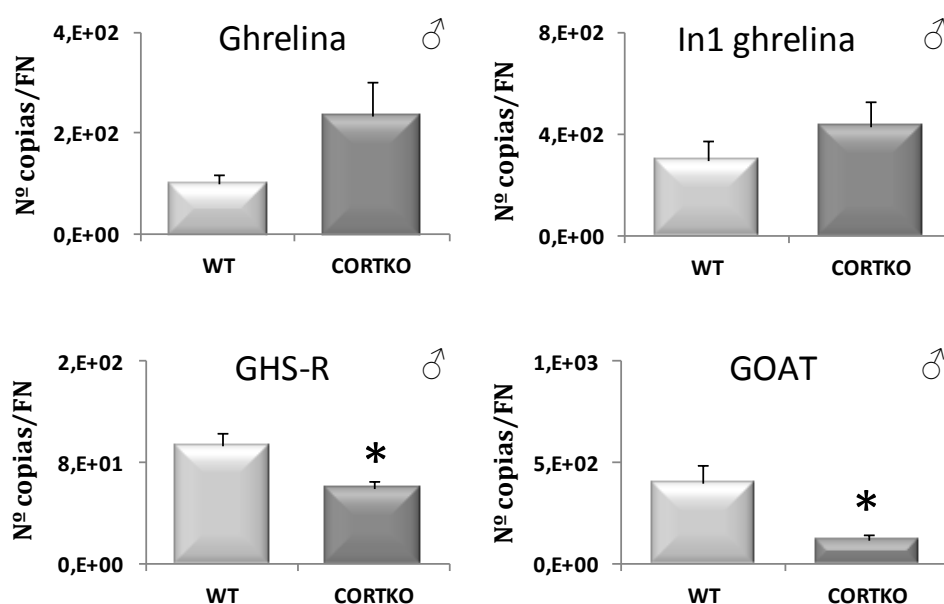


Fig. 27. Expresión de ghrelina, In1 ghrelina, GHS-R y GOAT en el páncreas de ratones WT y CORT-KO macho determinados mediante qRT-PCR. Los datos representan la media de 5 animales por grupo \pm SEM, expresados en nº de copias/FN (Factor de Normalización) (*: $p < 0,05$ vs WT).

De manera similar a lo observado en el páncreas de los machos, el nivel de expresión de ghrelina en animales CORT-KO hembra no varió significativamente frente a los niveles pancreáticos de animales WT (Fig. 28). Sin embargo, en contraposición a lo observado en machos, el número de copias de la variante In1 ghrelina se vio significativamente disminuido en el páncreas de CORT-KO. Además, la reducción de transcritos de GHS-R y GOAT observada en machos, no se produjo en el páncreas de ratones hembra permaneciendo su expresión frente al genotipo silvestre (Fig. 28).

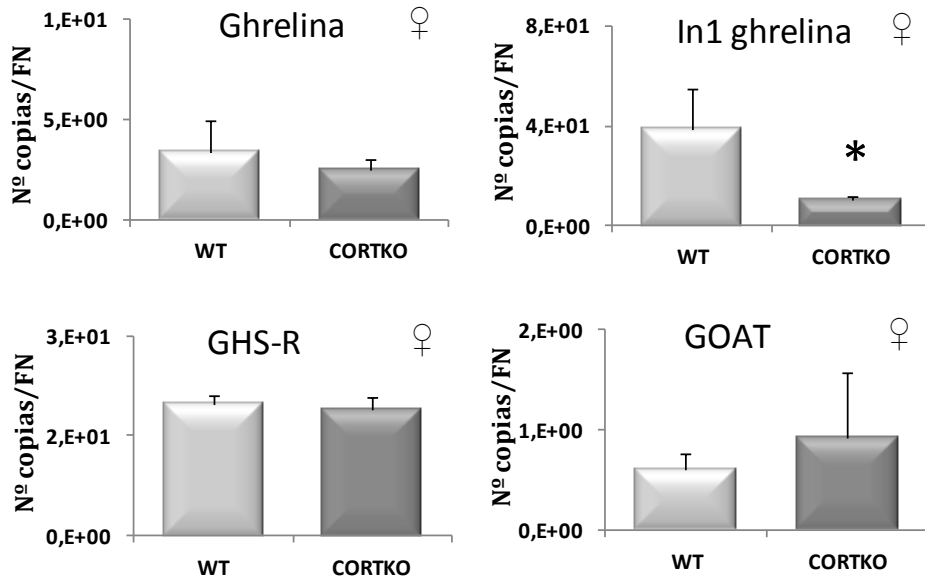


Fig. 28. Nivel de expresión de ghrelina, In1 ghrelina, el receptor de la ghrelina y la enzima GOAT en el páncreas de ratones WT y CORT-KO hembra determinado mediante qRT-PCR. Los datos representan la media de 5 animales por grupo \pm SEM, expresados como nº de copias/FN (Factor de Normalización) (*: $p < 0,05$ vs WT).

2.3. Insulina y glucagón.

En primer lugar se confirmó la presencia de transcritos de insulina y glucagón en el páncreas de ratones WT macho. Esta expresión constitutiva de insulina y glucagón no se vio alterada en ausencia de cortistatina endógena en ratones WT macho (Fig. 29).

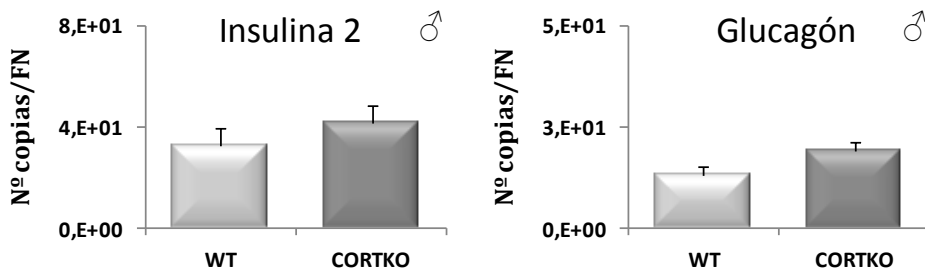


Fig. 29. Expresión de insulina y glucagón en el páncreas de ratones WT y CORT-KO macho determinado mediante qRT-PCR. Los datos representan la media de 4-6 animales por grupo \pm SEM, expresados como nº de copias/FN (Factor de Normalización).

El análisis de expresión de insulina y glucagón en ratones WT y CORT-KO hembra reveló idénticos resultados a los observados en ratones macho. Así, el número de transcritos de insulina y glucagón no se alteró en ausencia de CORT endógena (Fig. 30).

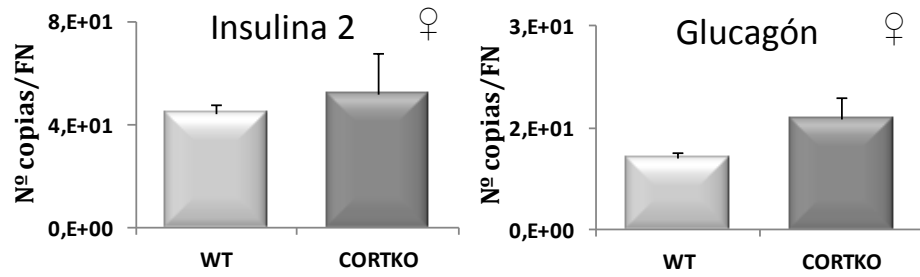


Fig. 30. Nivel de expresión de insulina y glucagón en el páncreas de ratones WT y CORT-KO hembra determinado mediante qRT-PCR. Los datos representan la media de 4-6 animales por grupo \pm SEM, expresados como n° de copias/FN (Factor de Normalización).

3. Modulación del perfil básico mediante la implantación de bombas de CORT en animales CORT-KO vs WT.

Tras analizar el perfil de expresión de los distintos componentes de los sistemas SST/CORT y ghrelina a nivel pancreático en animales carentes de CORT, se analizó el efecto de la administración de CORT exógena a animales CORT-KO hembra así como a sus respectivos controles (WT hembra) sobre la expresión de ghrelina y su variante truncada.

3.1. Sistema ghrelina.

La administración de CORT mediante bombas a ratones CORT-KO hembra, provocó un incremento significativo en la expresión de In1 ghrelina, aumento que no se observó en animales WT. Por otro lado, también se observó que la administración de CORT no alteró el nivel pancreático de ghrelina (Fig. 31).

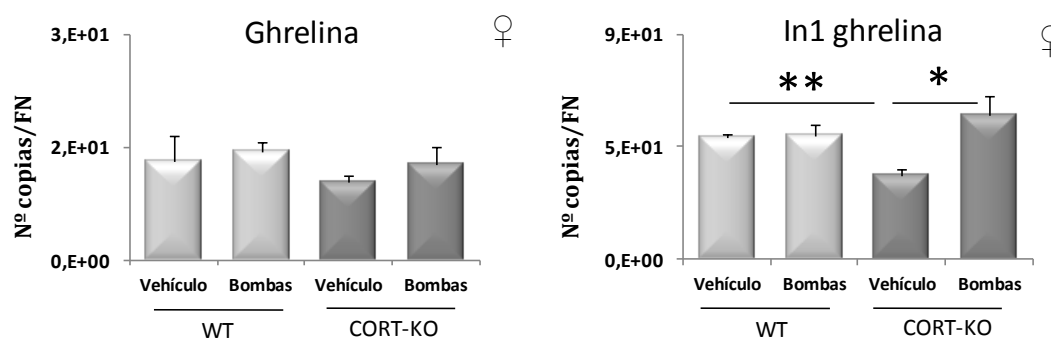


Fig. 31. Influencia de la administración de CORT sobre la expresión de ghrelina e In1 ghrelina en el páncreas de ratones WT y CORT-KO hembra con administración de CORT exógena o vehículo mediante bombas y determinada mediante qRT-PCR. Los datos representan la media de 5-6 animales por grupo \pm SEM, expresados como nº de copias/FN (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$).

3.2. Insulina.

La ausencia de CORT o su administración exógena a ambos genotipos, no alteró la expresión de los transcritos de insulina 2 en el páncreas de hembras en ninguno de los casos (Fig. 32).

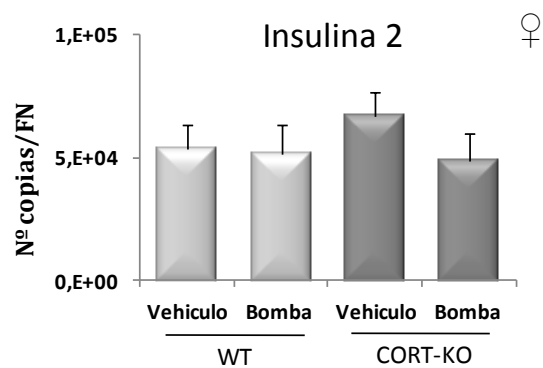


Fig. 32. Influencia de la administración de CORT sobre el nivel de expresión de insulina 2 en páncreas de ratones WT y CORT-KO hembra con administración de CORT exógena o vehículo mediante bombas determinada mediante qRT-PCR. Los datos representan la media de 5-6 animales por grupo \pm SEM, expresados como n° de copias/FN (Factor de Normalización).

4. Efecto de la obesidad inducida por dieta (DIO) sobre la expresión de los componentes de los sistemas SST/CORT y ghrelina en el páncreas de ratones WT y CORT-KO.

En este apartado, se estudió la posible modulación de la expresión de los componentes de los sistemas SST/CORT y ghrelina en el páncreas de ratones bajo distintas condiciones metabólicas como el ayuno y la obesidad. A continuación se describirá el análisis de una situación de obesidad inducida mediante la administración de una dieta baja o alta en grasas (LFD y HFD).

Para ello se consideraron diferentes diseños experimentales, detallados en los apartados siguientes, en función de la edad del animal en la que se comenzó a administrar la dieta (etapas infantil o madura). Así, se analizó la expresión de los sistemas SST/CORT y ghrelina tras la administración de una dieta HFD a partir de la semana 12^a de vida durante y durante un periodo de 13 semanas. Por otro lado, también se analizó la influencia de la administración de esta dieta durante la etapa infantil (a partir de la 4^a y 8^a semana de vida durante 16 y 38 semanas, respectivamente).

4.1. Animales WT adultos bajo dieta LFD o HFD.

En primer lugar, se analizó el efecto de la administración de una dieta LFD o HFD durante 13 semanas a animales adultos (12 semanas de edad) con objeto de evaluar su efecto sobre la expresión pancreática de los sistemas SST/CORT y ghrelina en ratones WT según el diseño reflejado en la Fig. 33.

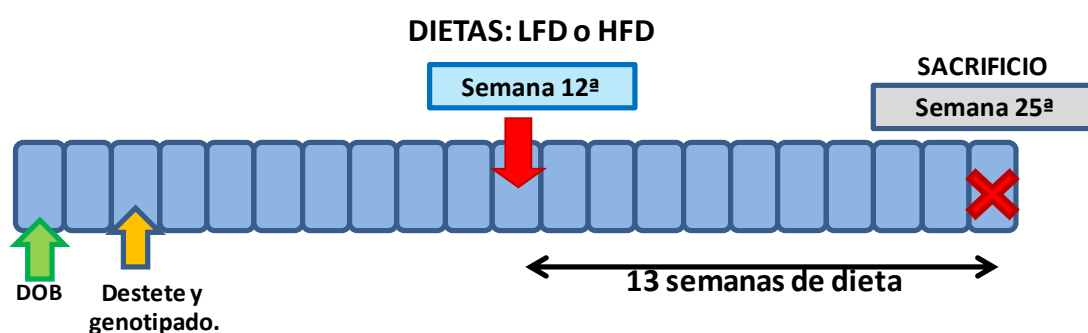


Fig. 33. Diseño experimental seguido para determinar el posible efecto de la dieta sobre la expresión pancreática de los sistemas SST/CORT y ghrelina. En él se reflejan la edad en la que se administran las dietas (LFD o HFD) así como la duración de las mismas (DOB: date of birth; fecha de nacimiento).

En primer lugar, se comprobó que la administración de una dieta HFD a partir de la semana 12^a de vida (etapa adulta), provocó un aumento significativo del peso de estos animales. Así,

mientras la administración de una dieta HFD durante 13 semanas aumentó el peso del animal en un 31,97 % con respecto a la dieta baja en grasa (n= 8-12 animales).

4.1.1. Sistema SST/CORT.

La dieta HFD administrada a ratones WT macho adultos no modificó significativamente la expresión constitutiva de los diferentes componentes del sistema SST a nivel pancreático, con la excepción del receptor truncado *sst5TMD1*, cuyo número de transcritos aumentó significativamente (Fig. 34).

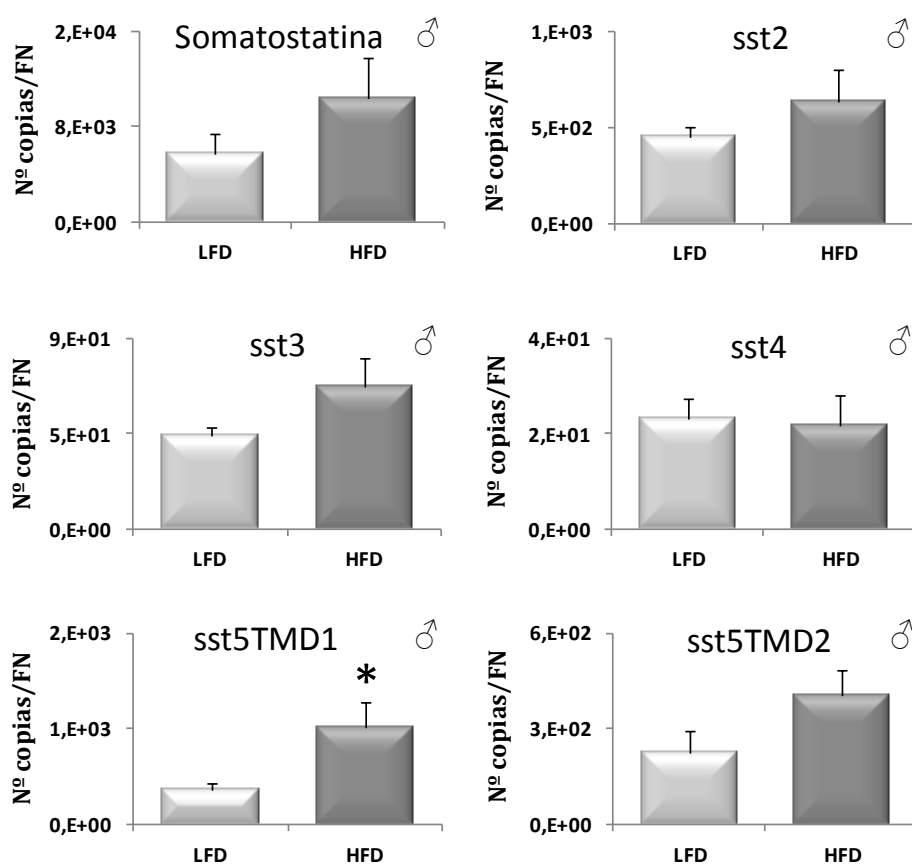


Fig. 34. Expresión de SST, *sst2*, *sst3*, *sst4* y de los receptores truncados *sst5 TMD1* y *TMD2* en el páncreas de ratones WT macho bajo condiciones de obesidad inducida por dieta (DIO) y determinada mediante qRT-PCR. Los datos representan la media de 8 animales por grupo \pm SEM, expresados como nº de copias/FN (Factor de normalización) (*: $p < 0,05$ vs LFD).

4.1.2. Sistema ghrelina.

Por otra parte, en el páncreas de ratones WT macho, la ghrelina, la enzima responsable de su acilación (GOAT) y su variante In1 ghrelina no vieron afectados sus respectivos niveles de

expresión como consecuencia de la administración de una dieta HFD durante 13 semanas (Fig. 35). En estas condiciones metabólicas, el número de copias de In1 ghrelina resultó 30,2 veces superior al de la propia ghrelina. Además, la expresión del receptor de ghrelina, GHS-R, aumentó significativamente en ratones obesos (Fig. 35).

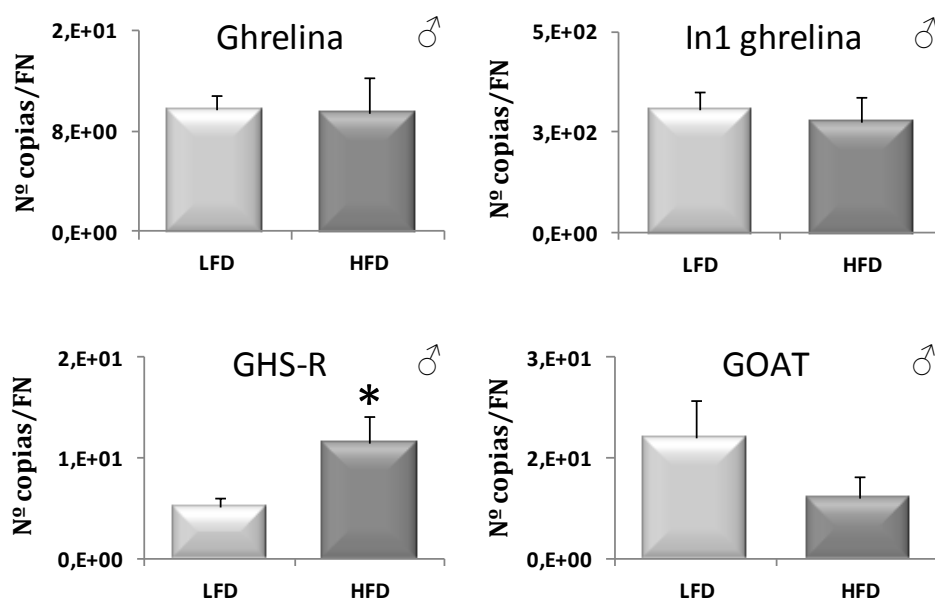


Fig. 35. Expresión de los componentes del sistema ghrelina en el páncreas de ratones WT macho en condiciones de obesidad inducida por dieta (DIO) y determinados mediante qRT-PCR. Los datos representan la media de 8 animales por grupo \pm SEM, expresados como nº de copias/FN (Factor de normalización) (*: $p < 0,05$ vs LFD).

4.1.3. Insulina.

Bajo estas mismas condiciones experimentales la expresión de los transcritos de insulina 2, forma mayoritaria productora de insulina, no se vio alterada mientras que la expresión del gen de insulina 1 aumentó con la administración de las dietas HFD (Fig. 36).

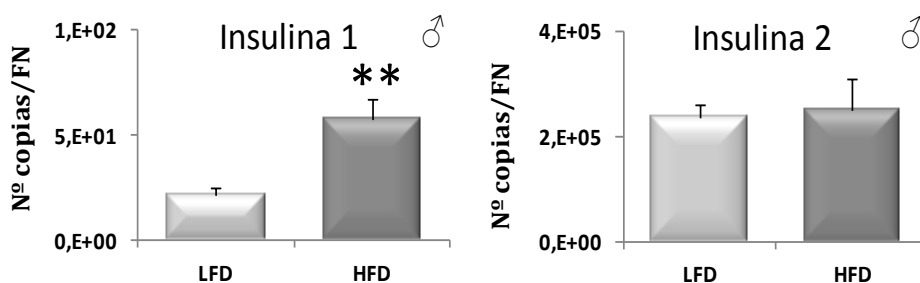


Fig. 36. Nivel de expresión de los transcritos 1 y 2 de insulina en el páncreas de ratones WT macho en condiciones de obesidad inducida por dieta (DIO) y determinados mediante qRT-PCR. Los datos representan la media de 8 animales por grupo \pm SEM, expresados como nº de copias/FN (Factor de normalización) (**: $p < 0,01$ vs LFD).

4.2. Animales WT adultos bajo dieta LFD o HFD de larga duración.

A continuación, se evaluó cómo la expresión de los sistemas objeto de estudio podría verse afectada por la administración de una dieta HFD durante 38 semanas en ratones WT hembra, según el diseño experimental representado en la Fig. 37.

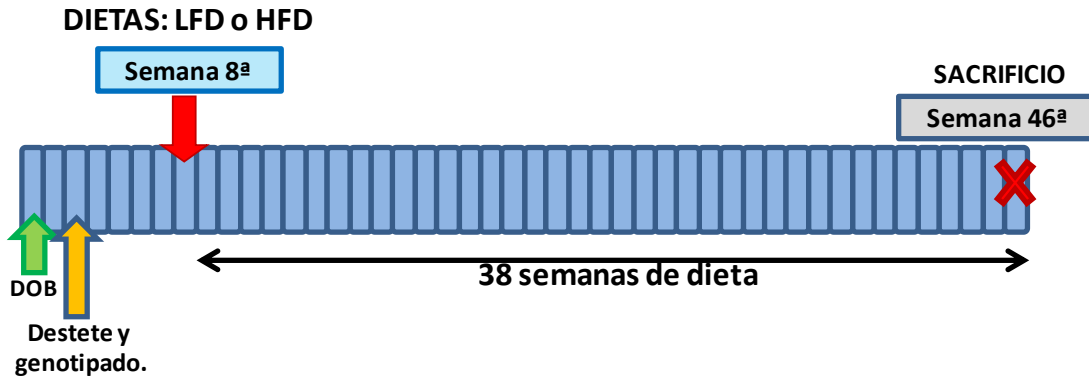


Fig. 37. Diseño experimental seguido para determinar el posible efecto de una dieta HFD administrada durante 38 semanas sobre la expresión pancreática de los sistemas SST/CORT y ghrelina. En la figura se refleja la edad en la que se administran la dieta (LFD o HFD) así como la duración de la misma (DOB: date of birth; fecha de nacimiento).

4.2.1. Sistema SST/CORT.

La expresión de SST no se vio afectada como consecuencia de la obesidad inducida con dieta HFD durante 38 semanas. Sin embargo, el número de transcritos del receptor *sst2* aumentó significativamente en estos animales obesos (Fig. 38).

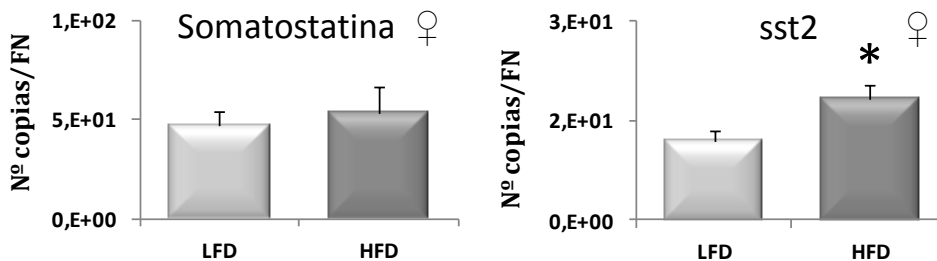


Fig. 38. Expresión de SST y *sst2* en el páncreas de ratones WT hembra sometidos a 38 semanas de DIO determinados mediante qRT-PCR. Los datos representan la media de 4-5 animales por grupo \pm SEM, expresados como nº de copias/FN (Factor de normalización) (*: $p < 0,05$ vs LFD).

4.2.2. Sistema ghrelina

El estudio del sistema ghrelina reveló que la expresión de algunos de sus componentes se veía afectado severamente bajo condiciones de obesidad de larga duración. Así, de los 14 ratones estudiados tan solo en 2 de ellos se observó expresión de ghrelina mientras que la presencia de la variante In1 ghrelina se detectó en 5 de esos animales, siendo el nivel de expresión detectado en ambos casos inferior al observado en el perfil básico.

4.2.3. Insulina y glucagón.

En el presente diseño experimental también se comprobó que la expresión de las hormonas características del páncreas endocrino, la insulina y el glucagón, no se alteró en situaciones de obesidad provocadas por una dieta HFD de larga duración, si bien el número de transcritos de insulina presentaba una clara tendencia a disminuir (Fig. 39).

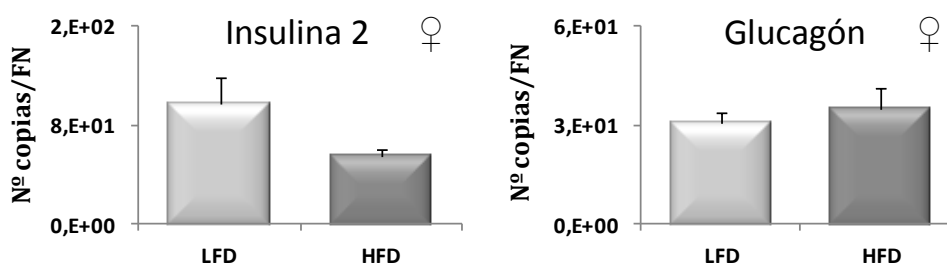


Fig. 39. Expresión de insulina y glucagón en páncreas de ratones WT hembra en condiciones de obesidad inducida por dieta (DIO) durante 38 semanas y determinados mediante qRT-PCR. Los datos representan la media de 4-6 animales por grupo \pm SEM, expresados como nº de copias/FN (Factor de Normalización).

4.3. Animales WT y CORT-KO jóvenes bajo dieta LFD o HFD.

Por otro lado, se evaluó la posible modulación de los sistemas objeto de estudio en situaciones de obesidad inducida en la etapa infantil o juvenil de animales WT y CORT-KO durante un periodo de 16 semanas. Este diseño experimental se representa en la Fig. 40.

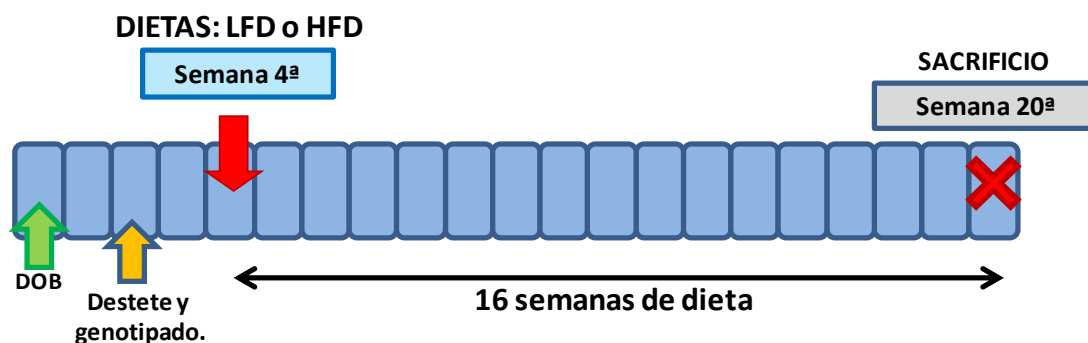


Fig. 40. Diseño experimental seguido para determinar el posible efecto de la dieta en animales jóvenes (a partir de la 4ª semana de vida) sobre la expresión pancreática de los sistemas SST/CORT y ghrelina. En él se refleja la edad del animal en la que se administraron las dietas (LFD o HFD) así como la duración de las mismas (DOB: date of birth; fecha de nacimiento).

La administración de la dieta HFD a animales jóvenes durante 16 semanas provocó un aumento significativo en el peso (g) independientemente de la presencia o ausencia de CORT endógena en el animal. No obstante, se observaron diferencias en la ganancia de peso entre ambos genotipos. Concretamente en el caso de los machos se observó que esta dieta provocó un aumento de un 31,33 % en el genotipo WT, mientras que en animales carentes en CORT la dieta HFD provocó un aumento de un 21,84 % (n=8-12 animales). Por otro lado, en las hembras la administración de la dieta alta en grasa provocó un aumento de un 23,24 % en el genotipo silvestre y un 19,50 % en las hembras CORT-KO bajo estas mismas condiciones (n=8-12 animales).

4.3.1. Sistema SST/CORT.

El estudio de los componentes del sistema SST/CORT en el páncreas de ratones WT y CORT-KO jóvenes alimentados con dieta LFD o HFD reveló la presencia de SST, de los receptores sst2, sst3, sst4 y de las isoformas truncadas sst5TMD1 y sst5TMD2. Sin embargo, la expresión

de *sst1*, *sst5* y *sst5TMD4* se mantuvo por debajo de los límites de sensibilidad de la técnica utilizada (Fig. 41).

El suministro de una dieta HFD provocó un aumento significativo en la expresión de los receptores *sst2* y *sst5TMD1* en el páncreas de los ratones WT macho, permaneciendo inalterable la expresión del resto de los componentes del sistema. La ausencia de CORT, junto con la administración de una dieta rica en grasas, provocó un aumento en la expresión de la isoforma *sst5TMD1*, siendo éste significativamente mayor que el aumento observado en ratones WT alimentados con esta dieta (Fig. 41).

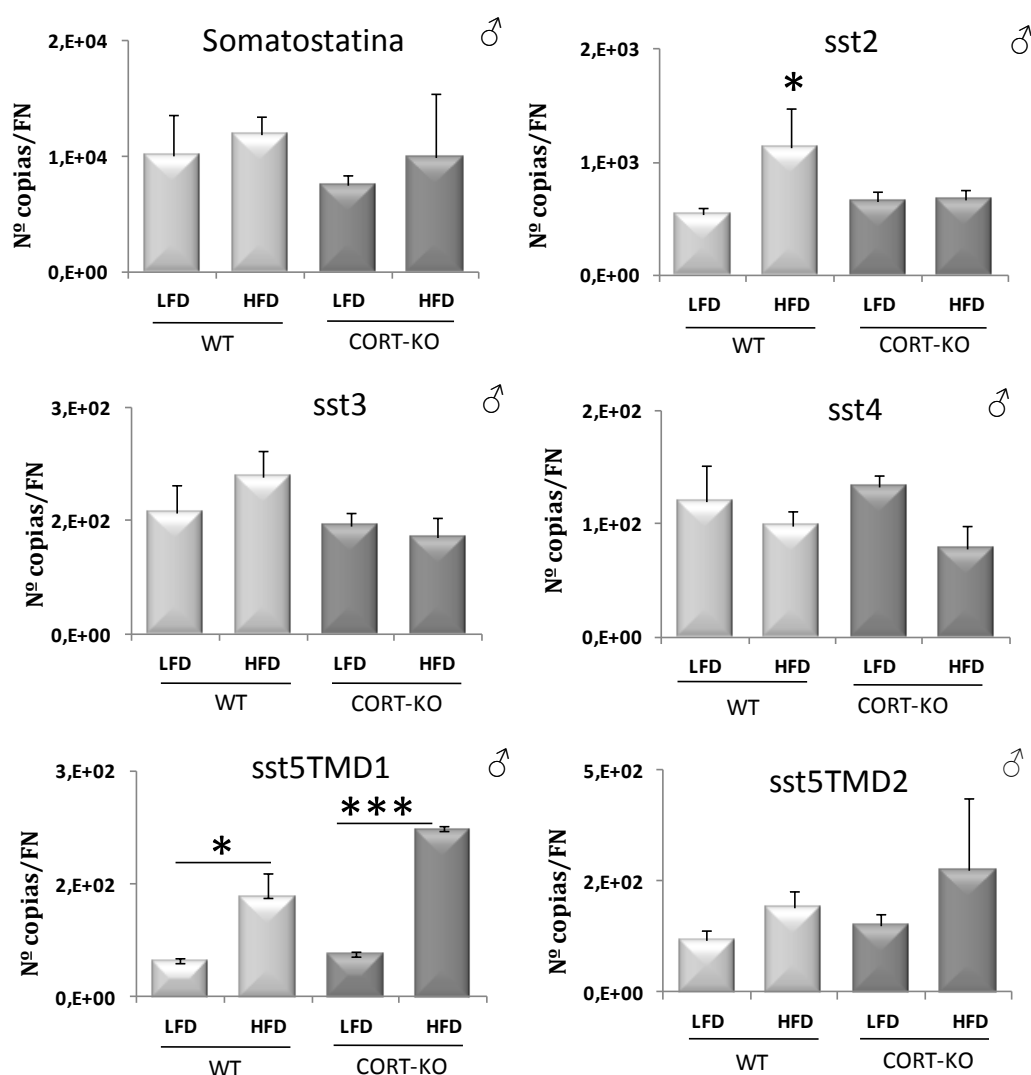


Fig. 41. Nivel de expresión de los componentes del sistema SST en páncreas de ratones WT y CORT-KO machos alimentados con dieta baja (LFD) o alta en grasa (HFD), determinados mediante qRT-PCR. Los datos representan la media de 6-11 animales por grupo \pm SEM, expresados como nº de copias/FN (Factor de Normalización) (*: $p < 0,05$).

En el páncreas de ratones WT y CORT-KO hembra se comprobó que el suministro de una dieta HFD provocó cambios similares a los descritos para ratones macho. Así, se observó un aumento significativo en la expresión de *sst2*. En este modelo, la expresión del receptor *sst5TMD1* no se vio alterada como consecuencia de la obesidad ni por la ausencia de CORT (Fig. 42).

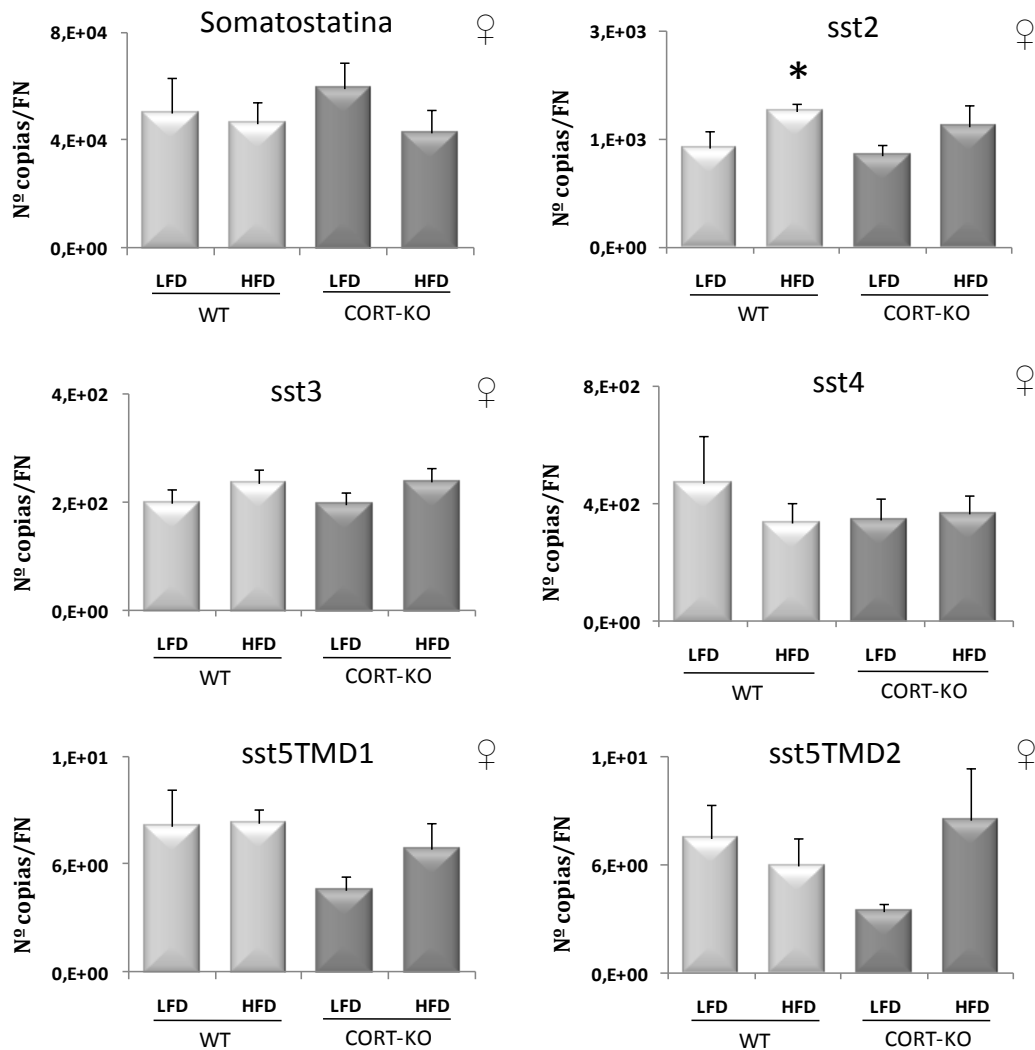


Fig. 42. Nivel de expresión de la SST, así como de los receptores *sst2*, *sst3*, *ss4*, *sst5TMD1* y *sst5TMD2* en páncreas de ratones WT y CORT-KO hembra con dieta baja (LFD) y alta en grasa (HFD), determinados mediante qRT-PCR. Los datos representan la media de 4-7 animales por grupo \pm SEM, expresados como nº de copias/FN (Factor de Normalización) (*: $p < 0,05$).

4.3.2. Sistema ghrelina.

En el caso particular de los ratones WT macho, se observó un aumento en el nivel de transcritos de ghrelina, de la isoforma In1 ghrelina y del receptor GHS-R bajo condiciones de obesidad (HFD). Sin embargo, estas mismas condiciones de obesidad provocaron una significativa reducción en la expresión de ghrelina, de In1 ghrelina, así como en el receptor de ghrelina, en el páncreas de animales con el genotipo carente de CORT (Fig. 43). Por otro lado, la expresión de la enzima GOAT disminuyó significativamente y de manera independiente de la dieta en el páncreas de los ratones CORT-KO macho (Fig. 43).

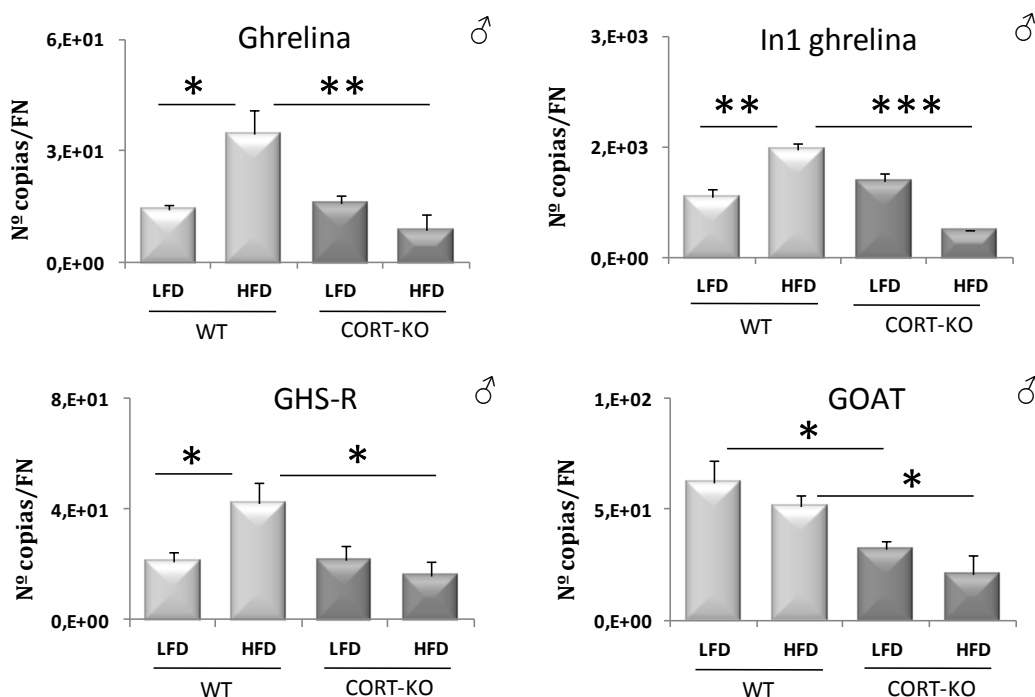


Fig. 43. Número de copias de ghrelina, In1 ghrelina, GHS-R y GOAT en páncreas de ratones WT y CORT-KO macho con dietas LFD y HFD, determinados mediante qRT-PCR. Los datos representan la media de 4-7 animales por grupo \pm SEM, expresados como n° de copias/FN (Factor de Normalización) (*: $p < 0,05$; **: $P < 0,01$; ***: $p < 0,001$).

En relación a la expresión de estos transcritos en el páncreas de animales WT hembra, ésta no se vio modificada como consecuencia de la administración de una dieta alta en grasas. Además, la ausencia de CORT, impidió el aumento significativo de ghrelina observado bajo estas condiciones de obesidad (Fig. 44).

Tanto en machos como en hembras, la expresión de transcritos de In1 ghrelina en el páncreas fue mayor a la expresión de la propia ghrelina (Fig. 43 y 44).

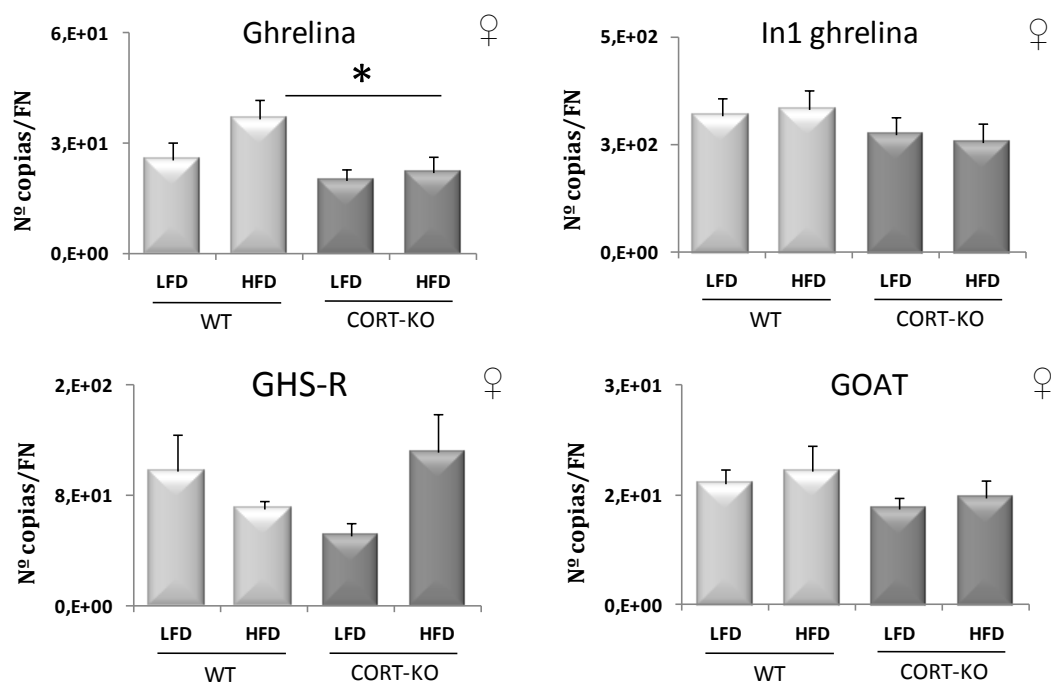


Fig. 44. Expresión de ghrelina, In1 ghrelina, GHS-R y GOAT en el páncreas de ratones WT y CORT-KO hembra bajo condiciones de obesidad inducida 16 semanas, determinados mediante qRT-PCR. Los datos representan la media de 6-11 animales por grupo \pm SEM, expresados como n° de copias/FN (Factor de Normalización) (*: $p < 0,05$).

4.3.3. Insulina y glucagón.

En este diseño experimental también se evaluó la expresión de insulina y glucagón (Fig. 45 y 46). Se observó que la administración de una dieta HFD provocaba un incremento en el nivel de transcritos de los genes insulina 1 e insulina 2 en el páncreas de ratones WT macho. Sin embargo, en estas mismas condiciones metabólicas, la ausencia de CORT impidió tal efecto. Por otro lado, la expresión pancreática de glucagón no se vio alterada como consecuencia de la obesidad o por la ausencia de la CORT (Fig. 45).

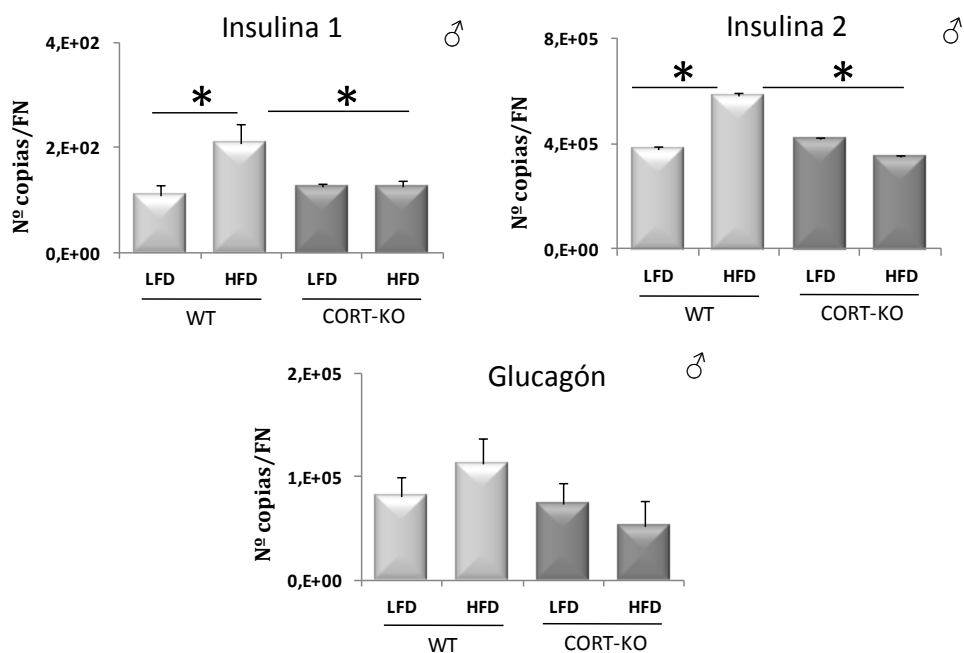


Fig. 45. Efecto de la DIO durante 16 semanas en la expresión de insulina y glucagón en páncreas de ratones WT y CORT-KO macho, determinada mediante qRT-PCR. Los datos representan la media de 4-7 animales por grupo \pm SEM, expresados como n° de copias/FN (*: $p < 0,05$ vs LFD).

En el páncreas de ratones hembra la expresión insulina y glucagón permaneció invariable como consecuencia de la dieta y de la falta de CORT, como se observa en la Fig. 46.

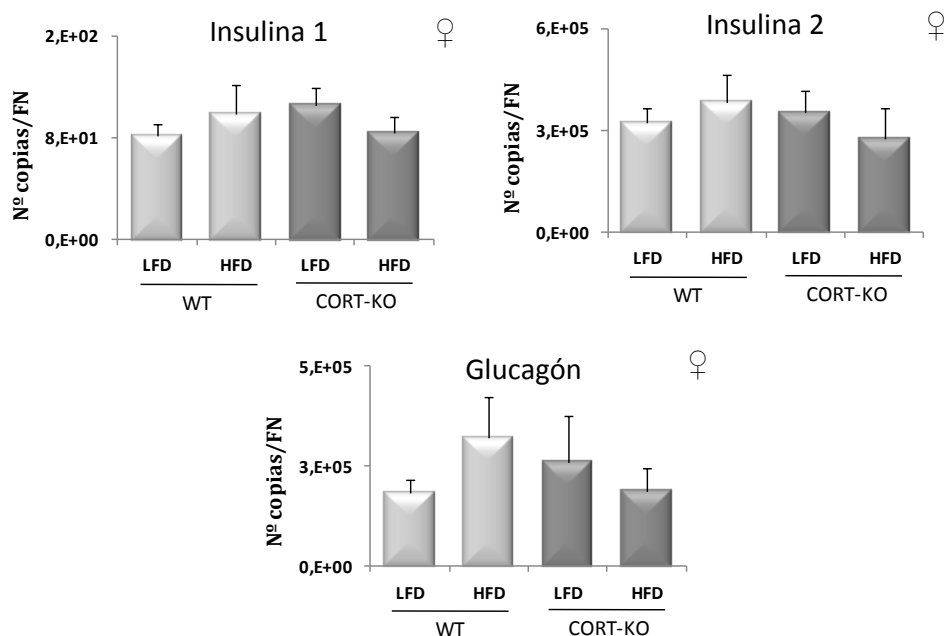


Fig. 46. Nivel de expresión de insulina y glucagón en páncreas de ratones WT y CORT-KO hembra con dietas LFD y HFD, determinado mediante qRT-PCR. Los datos representan la media \pm SEM de 4-7 animales por grupo, expresados como n° de copias/FN (*: $p < 0,05$ vs LFD).

4.3.4. Estudio en islotes pancreáticos de animales WT vs CORT-KO.

A algunos de los animales (n=4) sometidos al diseño experimental descrito en el apartado anterior (Apartado 4.3.), se les extrajo el páncreas y se procedió al aislamiento de islotes con objeto de determinar si la obesidad inducida por la dieta modulaba la expresión de los sistemas SST/CORT y ghrelina en el páncreas endocrino.

4.3.4.1. Sistema SST/CORT.

A nivel de páncreas endocrino los diferentes componentes del sistema SST (SST, sst2, sst3 y sst4) no alteraron su nivel de expresión bajo condiciones de obesidad (Fig. 47).

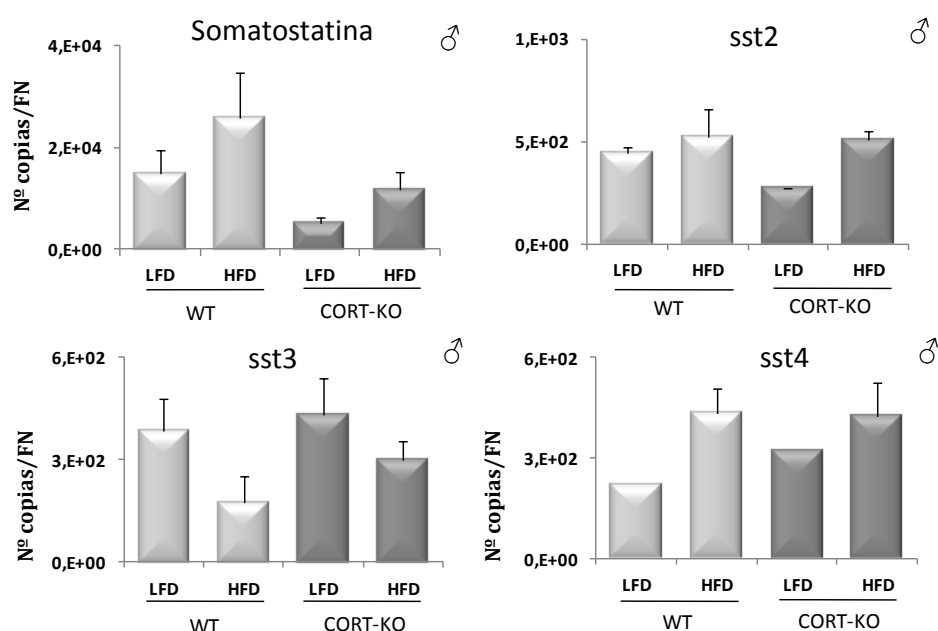


Fig. 47. Expresión de la SST y de los receptores sst2, sst3 y sst4 en el páncreas endocrino de ratones WT y CORT-KO macho bajo diferentes condiciones metabólicas, determinados mediante qRT-PCR. Los datos representan la media \pm SEM de 4 placas de cultivo (50 mg de islotes/placa) de al menos 3 experimentos independientes, expresados como n° de copias/n° de copias β actina.

4.3.4.2. Sistema ghrelina.

De la misma manera a lo descrito anteriormente (Fig. 43), en el páncreas endocrino se observó un aumento de ghrelina y GHS-R como consecuencia de la administración de una dieta alta en grasas. Este aumento no se observó en animales CORT-KO, en los que por el contrario, se observó una disminución significativa en la expresión de ghrelina y de GHS-R (Fig. 48).

Por otro lado, la administración de una dieta HFD no alteró la expresión de In1 ghrelina o GOAT a nivel del islote pancreático, si bien en animales CORT-KO obesos el número de transcritos de In1 ghrelina aumentó significativamente mientras que los transcritos de GOAT no alteraron su nivel de expresión (Fig. 48).

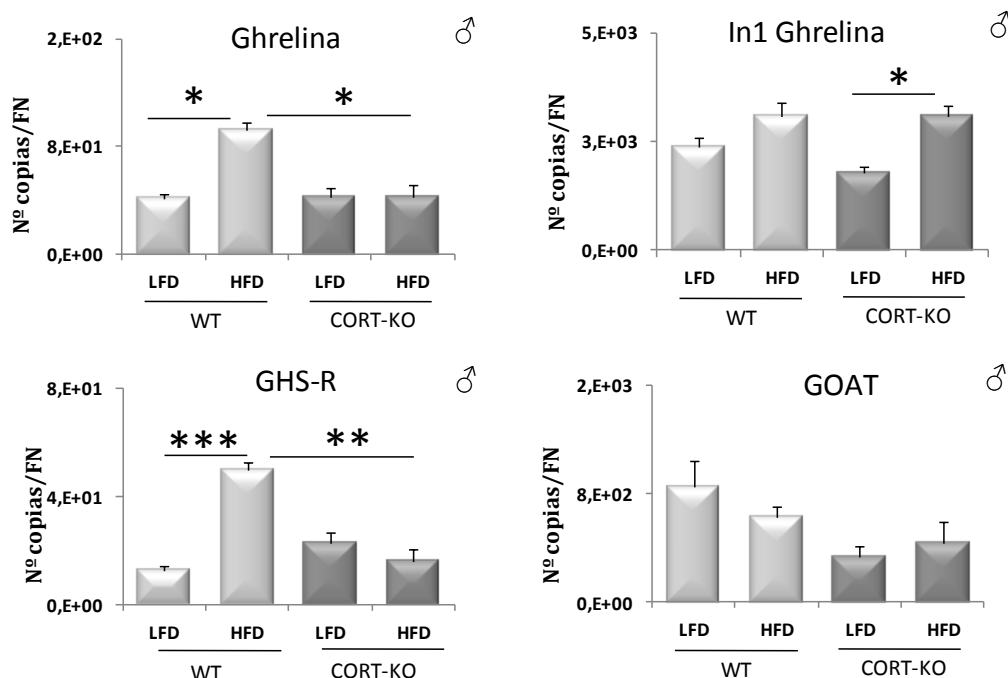


Fig. 48. Nivel de expresión de los componentes del sistema ghrelina determinados mediante qRT-PCR en islotes de ratones WT y CORT-KO macho bajo dietas baja (LFD) o alta en grasa (HFD). Los datos representan la media \pm SEM de 4 placas de cultivo (50 mg de islotes/placa) de al menos 3 experimentos independientes, expresados como n° de copias/ n° de copias β actina (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).

4.3.4.3. Insulina.

El nivel de expresión de insulina 2 aumentó significativamente en animales obesos WT macho, incremento que no se observó en islotes procedentes de animales CORT-KO (Fig. 49), de igual forma a lo descrito anteriormente a nivel de páncreas total (Fig. 45). Por otro lado, el número de transcritos del gen insulina 1 no se vio afectado ni por la administración de HFD ni la ausencia de CORT (Fig. 49).

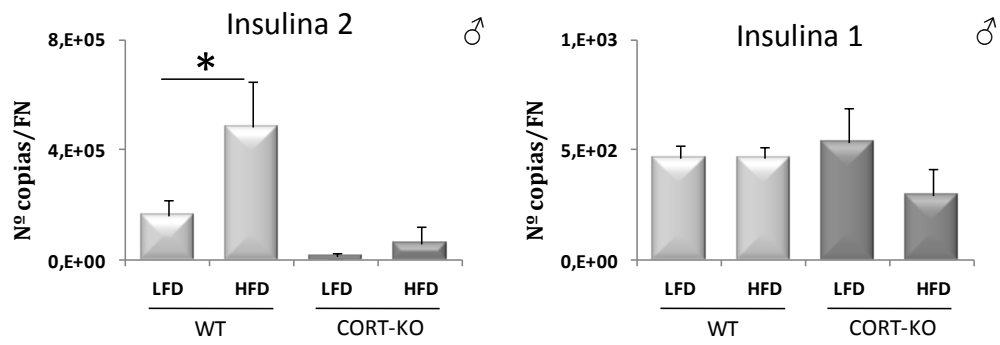


Fig. 49. Expresión de insulina en islotes de ratones WT y CORT-KO determinados mediante qRT-PCR. Los datos representan la media \pm SEM de 2-3 placas de cultivo (50 mg de islotes/placa) de al menos 3 experimentos independientes, expresados como nº de copias/ nº de copias β actina (*: $p < 0,05$; vs LFD).

5. Efecto del ayuno sobre la expresión de los componentes de los sistemas SST/CORT y ghrelina en el páncreas de ratones WT y CORT-KO.

5.1. Animales CORT-KO vs WT.

En este apartado se describe la posible modulación de la expresión de los componentes de los sistemas SST/CORT y ghrelina a nivel pancreático en situaciones de ayuno. Para ello, se llevó a cabo el diseño experimental que aparece reflejado a continuación (Fig. 50). Animales WT y CORT-KO de ambos sexos y de 14 semanas de edad recibieron una dieta alimenticia estándar desde su nacimiento y durante 24 o 48 horas antes del sacrificio se sometieron a ayuno.

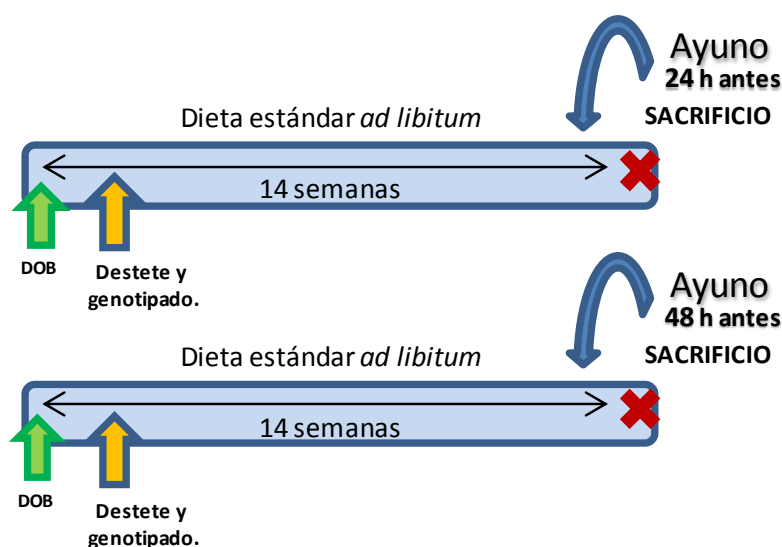


Fig. 50. Esquema que representa las condiciones de ayuno seguidas en este modelo experimental en ratones WT y CORT-KO macho y hembra. La figura refleja la duración de dicha condición (24 y 48 h) así como la alimentación administrada durante el desarrollo de estos animales (DOB: date of birth: fecha de nacimiento).

El efecto provocado por la privación total de comida provocó una reducción significativa del peso corporal independientemente del sexo o de la presencia o ausencia de CORT en el animal. En el caso de los machos WT el ayuno de 24 y 48 h causó una disminución de 11,6 y 20,2 % respectivamente, mientras que en el genotipo CORT-KO fue de un 15,3 y 20,3 % (n=8-12 animales). Esta condición metabólica también redujo el peso corporal en las hembras, observándose una disminución del 12,7 y 24,3 % en el genotipo silvestre y del 12,5 y 20,3 % en las hembras carentes en CORT, como consecuencia del ayuno de 24 y 48 h respectivamente (n=8-12 animales).

5.1.1. Sistema SST/CORT.

En el páncreas de ratones WT macho, el ayuno de 24 y 48 h provocó una disminución significativa en el número de transcritos de SST, efecto que no fue observado en animales CORT-KO (Fig. 51). Además, el ayuno de 24h provocó una disminución significativa de la expresión pancreática del receptor *sst2* de animales WT y CORT-KO macho. Sin embargo, un ayuno más prolongado, 48h, provocó un aumento de la expresión de *sst2* tan solo en animales CORT-KO macho (Fig. 51).

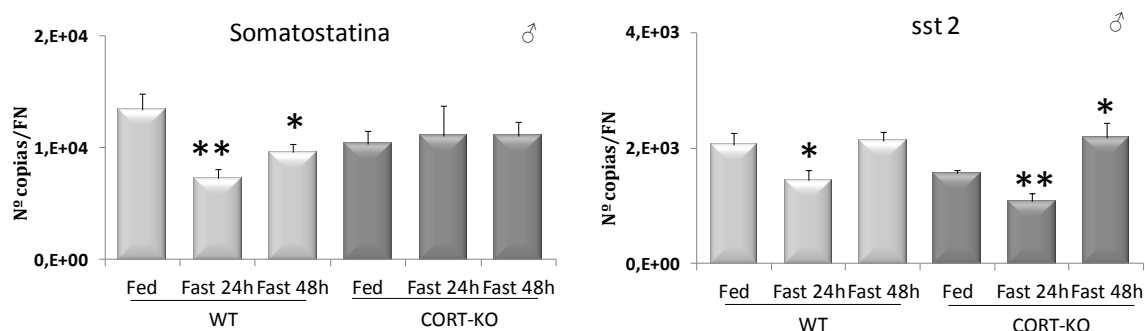


Fig. 51. Expresión de SST y *sst2* determinada mediante qRT-PCR en el páncreas de ratones WT versus CORT-KO macho en condiciones de ayuno durante 24 y 48 horas. Los datos representan la media \pm SEM de 7 animales por grupo, expresados como nº de copias/FN (Factor de normalización) (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$ vs Fed).

En el páncreas de ratones WT hembra, y a diferencia de lo descrito en el macho, el ayuno durante 48 h provocó una disminución significativa de los transcritos de SST (Fig. 52). En animales CORT-KO, se produjo una disminución significativa de SST tras el ayuno de 24h, como se observa en la Fig. 52.

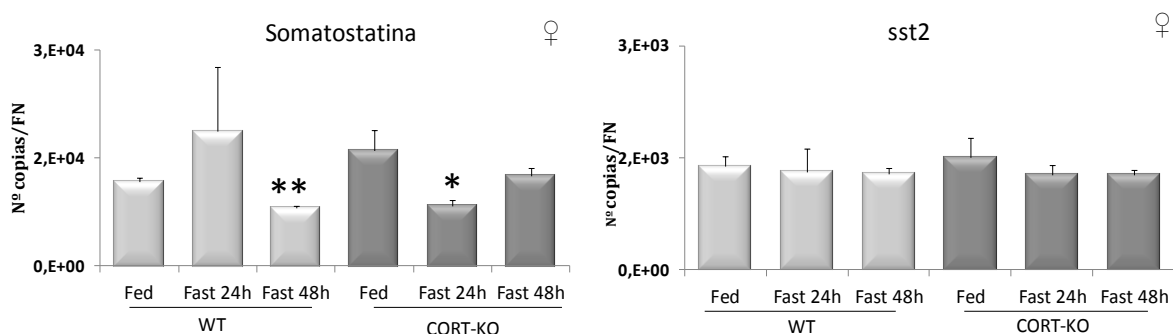


Fig. 52. Nivel de expresión de SST y *sst2* en el páncreas de ratones WT versus CORT-KO hembra en condiciones de ayuno durante 24 y 48 horas. Los datos determinados mediante qRT-PCR representan la media \pm SEM de 7 animales por grupo, expresados en nº de copias/FN (Factor de normalización) (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$ vs Fed).

5.1.2. Sistema ghrelina.

En animales WT y CORT-KO macho ninguna de estas situaciones de ayuno ensayadas (24 o 48 h) modificó la expresión pancreática de ghrelina (Fig.53).

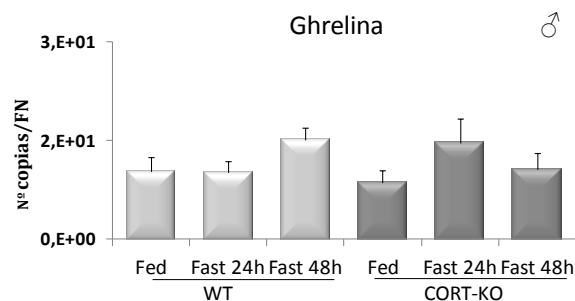


Fig. 53. Número de transcritos de ghrelina determinados mediante qRT-PCR en el páncreas de ratones WT versus CORT-KO macho bajo distintas condiciones de ayuno (24 y 48 horas). Los datos representan la media \pm SEM de 7 animales por grupo, expresados como n° de copias/FN (Factor de normalización).

En hembras, 48 h de ayuno provocaron un aumento en la expresión de ghrelina (Fig. 54).

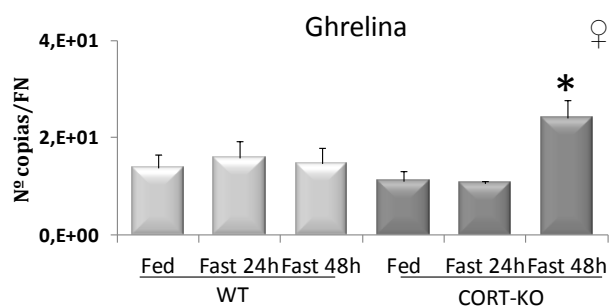


Fig. 54. Expresión de ghrelina en el páncreas de ratones WT versus CORT-KO hembra en condiciones de ayuno durante 24 y 48 horas determinados mediante qRT-PCR. Los datos representan la media \pm SEM de 7 animales por grupo, expresados como n° de copias/FN (Factor de normalización) (*: $p < 0,05$ vs Fed).

5.1.3. Insulina y glucagón.

El ayuno no modificó la expresión del gen de la insulina 2 sin embargo, el número de transcritos de insulina 1 aumentó significativamente tanto en animales WT como CORT-KO macho (Fig. 55). En relación a la expresión de glucagón, éste aumentó su expresión como consecuencia del ayuno en animales WT mientras que tan solo aumentó en animales CORT-KO macho tras 24h de ayuno (Fig. 55).

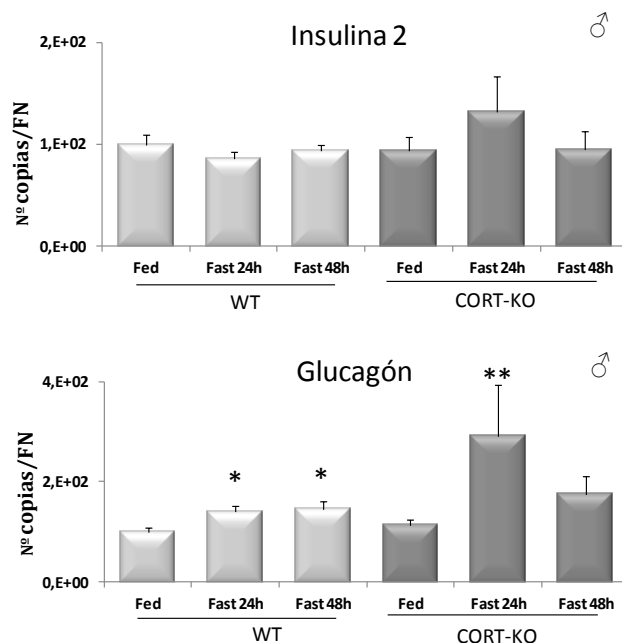


Fig. 55. Efecto del ayuno sobre la expresión de insulina y glucagón en ratones WT y CORT-KO macho. Los datos representan la media \pm SEM de 7 animales por grupo, expresados como nº de copias/FN (Factor de normalización) (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$ vs Fed).

En el caso de ratones hembra, el ayuno de 24 y 48h disminuyó significativamente la expresión del gen insulina 2 en animales de genotipo WT mientras que aumentó significativamente el número de transcritos de insulina 1 en animales de genotipo CORT-KO. En relación a la expresión de glucagón, el ayuno de 48h aumentó significativamente su expresión tanto en animales WT como CORT-KO mientras que tras 24h de ayuno tan solo aumentó el número de transcritos de glucagón en animales de genotipo CORT-KO (Fig. 56).

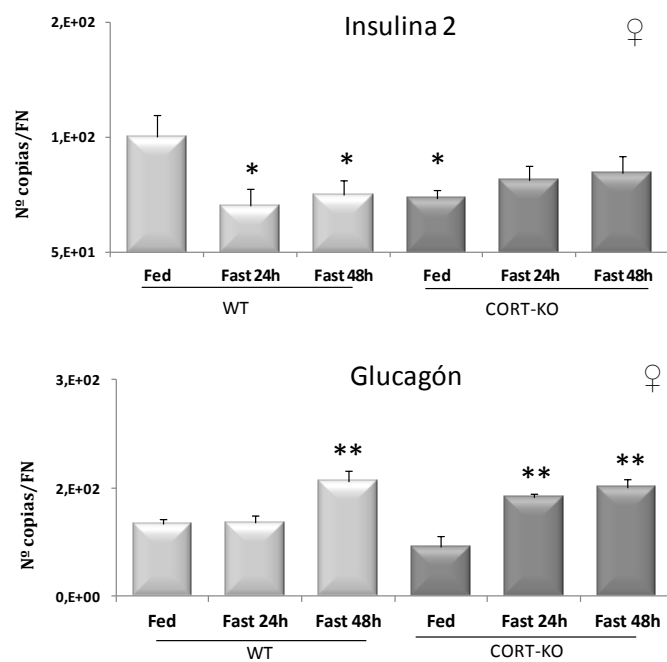


Fig. 56. Expresión de insulina y glucagón en el páncreas de ratones WT vs CORT-KO de hembras en condiciones de ayuno durante 24 y 48 horas determinados mediante qRT-PCR. Los datos representan la media \pm SEM de 7 animales por grupo, expresados como n^o de copias/FN (Factor de normalización) (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$ vs Fed).

6. Perfil básico de expresión de los componentes de los sistemas SST/CORT y ghrelina en islotes pancreáticos de ratones WT y CORT-KO.

La expresión constitutiva de los sistemas objeto de estudio se determinó sobre islotes pancreáticos mantenidos en cultivo durante 10 días. Tras este periodo, se extrajo el ARN, se sintetizó cDNA para por último determinar el perfil básico de expresión de los componentes de los sistemas SST/CORT y ghrelina en el páncreas endocrino.

6.1. Sistema SST/CORT.

El análisis de la expresión de los componentes del sistema SST/CORT en islotes pancreáticos obtenidos de animales WT y CORT-KO macho reveló la presencia significativa de SST y del receptor *sst2*. Además, en el caso particular de la SST, su nivel de expresión se vio reducido en el páncreas endocrino de ratón CORT-KO, mientras que la expresión del *sst2* aumentó significativamente en animales CORT-KO frente al genotipo WT (Fig. 57).

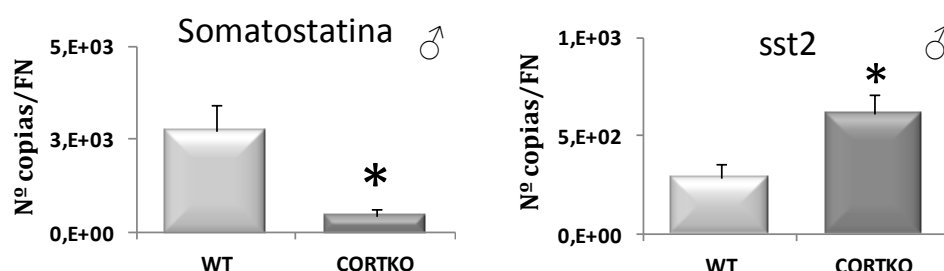


Fig. 57. Expresión de SST y *sst2* en el páncreas endocrino de ratones WT y CORT-KO. Los datos representan la media \pm SEM de 3-5 placas de cultivo (50 mg de islotes/placa) obtenidos de al menos 3 experimentos independientes expresados como n° de copias/n° de copias de β actina (*: $p < 0,05$).

6.2. Sistema ghrelina.

Los diferentes componentes ghrelina, In1 ghrelina y GOAT se evaluaron a nivel de páncreas endocrino obtenidos de ratones WT y CORT-KO macho (Fig. 58). De manera similar a los descrito en el páncreas total (Apartado 2.1.2.), la expresión de ghrelina e In1 ghrelina no varió entre animales WT y CORT-KO, si bien la variante In1 ghrelina se expresó en mayor proporción (9,72 veces) que la ghrelina tanto en islotes de animales WT como CORT-KO. Igualmente, no se observaron diferencias significativas en la expresión de GOAT obtenida de

animales WT y CORT macho (Fig. 58). Sin embargo, en islotes en cultivo procedentes de animales CORT-KO se detectó una disminución significativa en el número de transcritos de GHS-R en comparación a islotes en cultivo obtenidos de animales WT (Fig. 58).

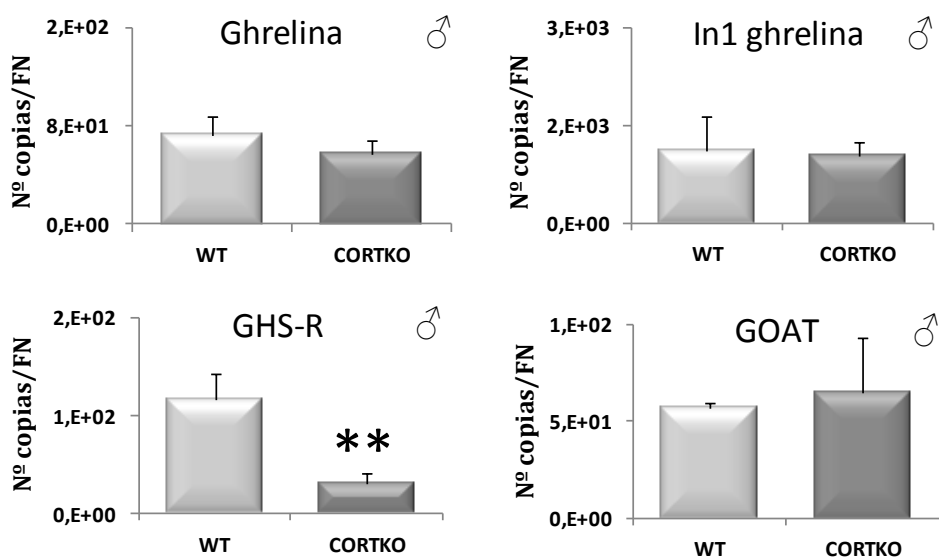


Fig. 58. Expresión de ghrelina, In1 ghrelina, el receptor GHS-R y GOAT en islotes de ratones WT y CORT-KO macho determinados mediante qRT-PCR. Los datos representan la media \pm SEM de 3-5 placas (50 mg de islotes/placa) de al menos 3 experimentos independientes expresados como número de copias/ n° de copias de β actina (**:p<0,01 vs WT).

6.3. Insulina y glucagón.

El análisis de la expresión de insulina y glucagón en islotes en cultivo obtenidos a partir de animales WT y CORT-KO macho mostró una reducción significativa en la expresión de ambas hormonas pancreáticas como consecuencia de la falta de CORT en el animal (Fig. 59).

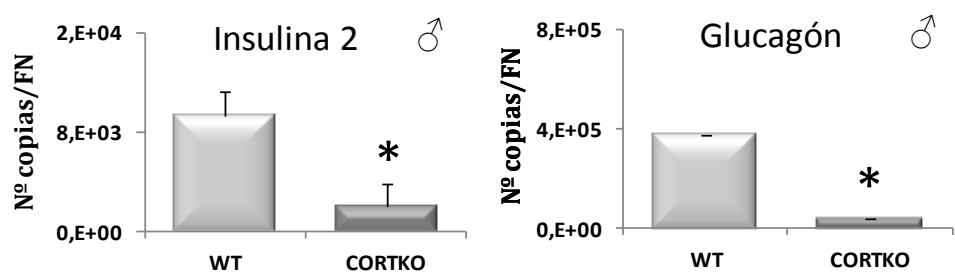


Fig. 59. Número de transcritos de insulina y glucagón en islotes de ratones WT y CORT-KO macho determinados mediante qRT-PCR. Los datos representan la media \pm SEM de 3-5 placas (50 mg de islotes/placa) de al menos 3 experimentos independientes expresados como número de copias/ n° de copias de β actina (*:p<0,05).

7. Modulación de la expresión de los componentes de los sistemas SST/CORT y ghrelina en islotes pancreáticos de ratones WT y CORT-KO en cultivo.

En este apartado se analizó el posible efecto de la administración de cortistatina 14 (CORT-14) 10 nM durante 24 h sobre la expresión de los sistemas objeto de estudio en islotes pancreáticos en cultivo.

7.1. Sistema SST/CORT.

El tratamiento con CORT-14 a islotes de ratones WT macho (Fig. 60) provocó un ligero aumento en la expresión tanto de la SST y como del sst2, aumento que no alcanzó significación estadística. Igualmente, en el caso del genotipo CORT-KO tampoco se observaron cambios en la expresión de la SST o del sst2 en islotes tratados cuando se compararon con sus respectivos controles (Fig. 60).

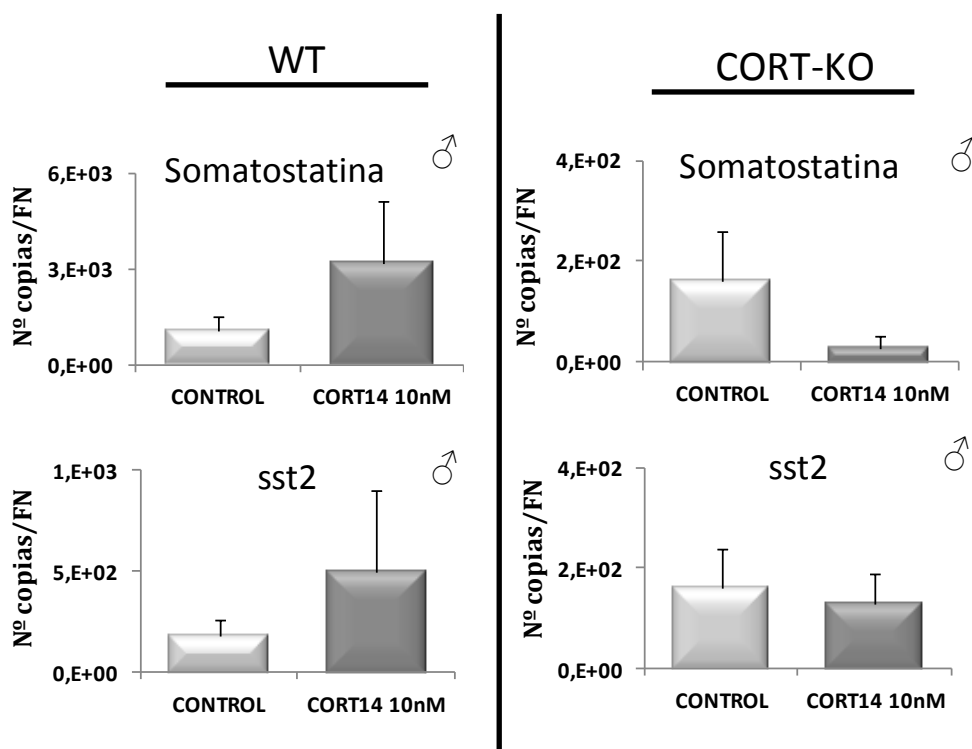


Fig. 60. Nivel de expresión del sistema SST en islotes de ratones WT y CORT-KO macho tratados con CORT-14 10 nM, determinado mediante qRT-PCR. Los datos representan la media \pm SEM de 2-4 placas de cultivo (50 mg de islotes/placa) de al menos 3 experimentos independientes, expresados como nº de copias/ nº de copias de β actina.

7.2. Sistema ghrelina.

A continuación, se analizó la expresión de ghrelina, In1 ghrelina y GOAT en islotes en cultivo obtenidos de animales WT y CORT-KO, tratados con CORT-14 10nM durante 24 h (Fig. 61). Este tratamiento no alteró la expresión constitutiva de ninguno de los componentes del sistema ghrelina en islotes obtenidos de animales WT (Fig. 61). Por otro lado, en los islotes con genotipo carente de CORT, el tratamiento con ésta provocó una reducción en los niveles de ghrelina en comparación a los islotes no tratados. Los niveles de In1 ghrelina y GOAT permanecieron invariables en los islotes de los machos de ambos genotipos independientemente del tratamiento (Fig. 61).

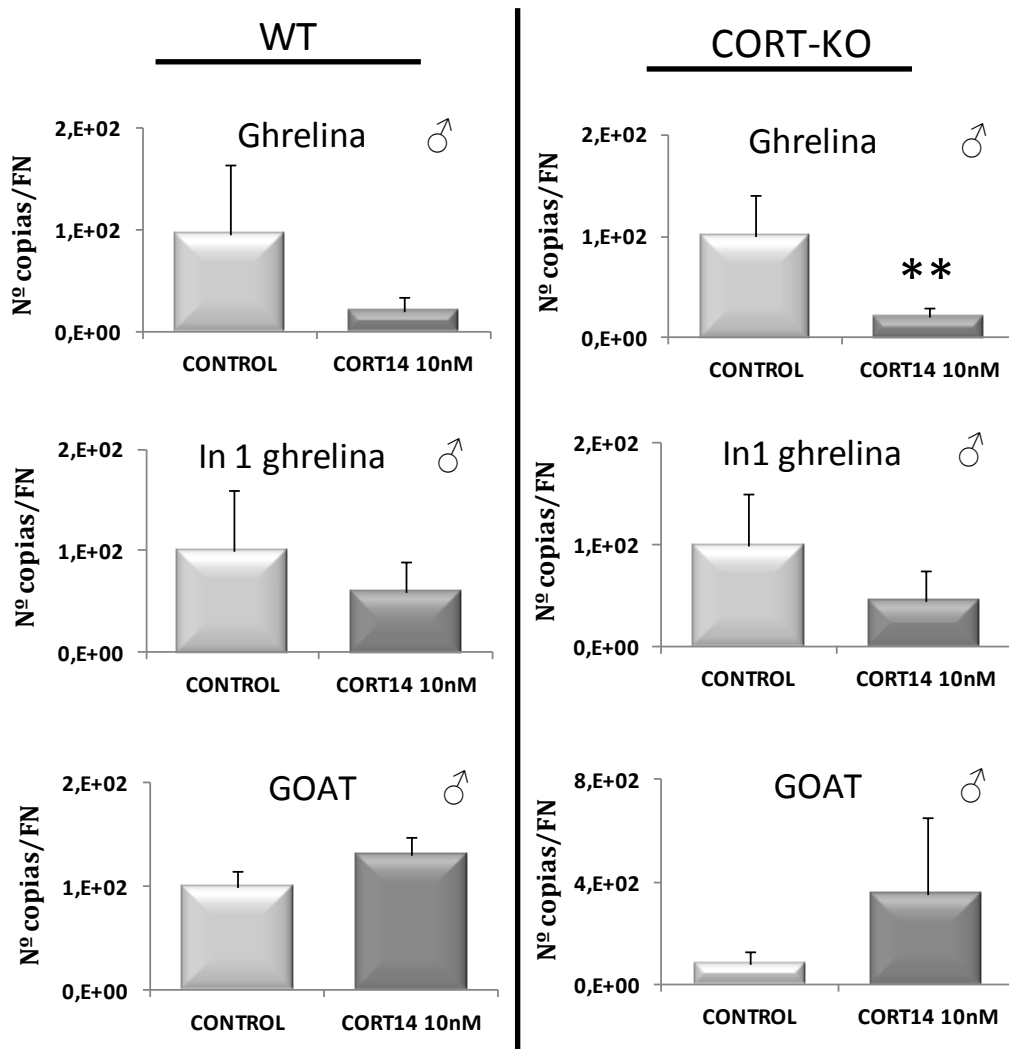


Fig. 61. Expresión de la ghrelina, In1 ghrelina y GOAT en islotes de ratones WT y CORT-KO macho tratados con CORT-14 10 nM, determinado mediante qRT-PCR. Los datos representan la media \pm SEM de 2-4 placas (50 mg de islotes/placa) de al menos 3 experimentos independientes, expresados como n° de copias/ n° de copias de β actina (**: $p < 0,01$ vs control).

7.3. Insulina.

Por último, se estudió el nivel de expresión de la insulina en los islotes pancreáticos en cultivo tratados con CORT-14 10 nM durante 24 h (Fig. 62). El análisis de la expresión del gen insulina 2 reveló que el tratamiento con CORT provocó un aumento significativo en el número de transcritos de insulina 2 en islotes pancreáticos en cultivo procedentes de animales WT (Fig. 62). Sin embargo, este aumento no se observó cuando el tratamiento se administró sobre islotes pancreáticos en cultivo de animales CORT-KO (Fig. 62).

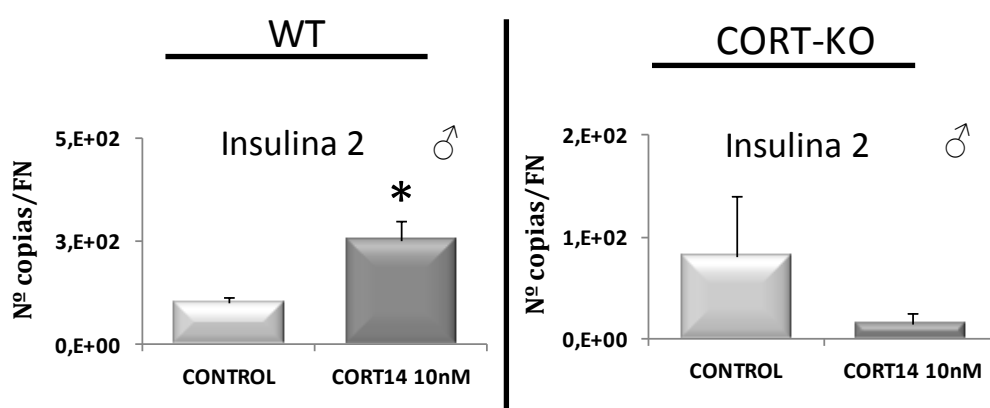


Fig. 62. Número de transcritos del gen insulina 2 determinado mediante qRT-PCR en islotes de ratones WT y CORT-KO macho tratados con CORT-14 10 nM,. Los datos representan la media \pm SEM de 3-5 placas (50 mg de islotes/placa) de al menos 3 experimentos independientes, expresados como nº de copias/nº copias de β actina (*: $p < 0,05$ vs control).

Discusión

La presente Tesis Doctoral tuvo como objetivo general la caracterización de los componentes del sistema SST/CORT y ghrelina a nivel pancreático y su relación con la función pancreática. Para alcanzar dicho objetivo nos propusimos los siguientes objetivos específicos:

- 1) Analizar histológicamente el páncreas de los animales CORT-KO en comparación a los animales WT y determinar el patrón de expresión de la SST, CORT, ghrelina, sus receptores y variantes en estos modelos animales.
- 2) Estudiar la posible modulación de la expresión de los sistemas SST/CORT y ghrelina bajo condiciones metabólicas extremas como la obesidad inducida por la dieta y el ayuno.
- 3) Análisis funcional del páncreas endocrino mediante cultivo de islotes pancreáticos procedentes de animales CORT-KO en respuesta a distintas condiciones experimentales.

1. Sistema SST/CORT a nivel pancreático.

Inmediatamente después del descubrimiento de la SST a partir de muestras de origen hipotalámico y tras la descripción de su acción inhibitoria sobre la liberación de la hormona del crecimiento (Alberti *et al.*, 1973), se detallaron otras acciones de la SST sobre las secreciones neuroendocrinas. Particularmente a nivel pancreático, se evidenció su carácter inhibitorio sobre la liberación de insulina y glucagón, documentando además la producción de SST por las células delta del páncreas endocrino (Noe, 1981).

En la presente Tesis confirmamos la expresión de SST y diferentes componentes de su sistema en el páncreas de animales WT, tal y como se había determinado previamente mediante diferentes aproximaciones metodológicas (Strowski & Blake, 2008). Además, hemos podido comprobar que la ausencia de CORT modula la expresión de determinados componentes del sistema SST a nivel pancreático, en particular la SST y el receptor sst2. Actualmente es bien conocida ambos péptidos podrían influenciar su expresión. Así, en el año 2007, se demostró que la ausencia de SST en ratones macho estaba íntimamente relacionada con un aumento significativo de la expresión de CORT a nivel hipotalámico (Luque & Kineman, 2007). Sin embargo, y más recientemente, se ha descrito que la ausencia de CORT mantiene inalterada la expresión de SST a nivel hipotalámico (Córdoba-Chacón *et al.*, 2011c).

En nuestro estudio, detectamos una disminución significativa de la expresión de SST en el páncreas de ratones CORT-KO macho, mientras que la expresión del receptor sst2 permanece invariable. Sin embargo, en el páncreas de ratones CORT-KO hembra la expresión de SST

permanece invariable mientras que el número de transcritos *sst2* aumenta significativamente. La reducción de la expresión de SST en el páncreas de ratones macho coincide con la descrita concentración disminuida, si bien no significativa, de SST circulante en animales CORT-KO (Córdoba-Chacón *et al.*, 2011b), sugiriendo y apoyando la contribución parcial de la SST de origen pancreático en la concentración de SST circulante. En ratones CORT-KO hembra, la expresión de SST pancreática permaneció invariable lo que sugeriría que la regulación de la expresión de SST y CORT sería género y tejido dependiente, tal y como ha sido previamente propuesto por otros autores (Luque & Kineman, 2007; Córdoba-Chacón *et al.*, 2011b). Por otro lado, nuestros datos sobre la expresión disminuida de la SST en el páncreas de animales carentes de CORT, descartaría una vez más la acción compensadora que ejerce la CORT sobre la SST a nivel sistémico y viceversa, como también se ha propuesto en otros estudios (de Lecea & Castaño, 2006; Gahete *et al.*, 2010a).

La SST realiza sus acciones biológicas mediante el acoplamiento a 5 receptores diferentes, *sst1-sst5*. El análisis de la expresión de estos receptores ha generado una gran controversia durante los últimos años, muy probablemente debido a la diferente sensibilidad de las diversas aproximaciones metodológicas empleadas (Strowski & Blake, 2008). En la presente Tesis Doctoral, basándonos en el diseño específico de cebadores o primers para las distintas secuencias de los receptores de SST de ratón, hemos podido comprobar que la expresión de los receptores *sst1* y *sst5* no superó los límites de detección de la técnica empleada, qRT-PCR. Sin embargo, hemos podido confirmar la presencia de los *sst2*, *sst3* y *sst4* en los genotipos WT y CORT-KO tanto a nivel de páncreas total como en fracciones pancreáticas enriquecidas en islotes de Langerhans. En cualquier caso, el nivel de expresión del *sst2* fue superior al del *sst3* y *sst4*, confirmando lo observado por otros autores (Kumar *et al.*, 1999) y validando consecuentemente nuestra aproximación metodológica.

De manera interesante, la ausencia de CORT provocó una sobreexpresión de *sst2* en el páncreas de ratones CORT-KO hembra al igual que para lo observado en cultivos de islotes procedentes de animales del mismo genotipo. Diferentes estudios han establecido que el receptor *sst2* media las acciones inhibitorias de la SST sobre la producción de glucagón por las células alfa del islote, así como la liberación de insulina por las células beta (Strowski *et al.*, 2000 ; Winzell & Ahrén, 2007). Más recientemente y en humanos, se ha descrito que *sst2* y no el receptor *sst5* como había sido descrito inicialmente, sería el receptor sobre el que la SST ejerce sus acciones inhibitorias sobre las células alfa y beta, y por tanto, poseería un papel crucial sobre la función pancreática (Kailey *et al.*, 2012). En este contexto, y dada la afinidad de la CORT por el receptor *sst2*, ésta podría ejercer sus acciones sobre la función pancreática a través del mismo sobre el que además regularía su expresión.

En relación a la regulación mediante el tratamiento con CORT 10nM no observamos cambios en la expresión del *sst2* de islotes pancreáticos de ambos genotipos. Tampoco la SST ha sufrido cambios estadísticamente significativos, sin embargo se ha observado una tendencia a incrementar sus niveles en islotes de ratones WT tratados con CORT 10nM, y a reducirse en CORT-KO con el mismo tratamiento. Debido a que los animales carentes en CORT tienen un mayor número de transcritos del receptor *sst2*, cabe la posibilidad de que la tendencia a reducir los niveles de SST en ratones de genotipo KO podría estar mediada por el *sst2*, mientras que el efecto estimulador de la SST en animales WT podría estar mediado por otro receptor. No obstante, el estudio con antagonistas así como el uso de otras técnicas se hacen necesarias a la hora de confirmar esta hipótesis.

Aunque el número de estudios sobre el papel de la CORT a nivel pancreático son escasos, Broglio *et al* describieron que la CORT, al igual que la SST, inhibe la liberación de insulina producida por las células beta (Broglio *et al.*, 2002). Un año más tarde, se documentó la presencia de CORT en el páncreas humano y consecuentemente se sugirió una posible acción local moduladora de la CORT sobre la liberación de insulina y glucagón (Papotti *et al.*, 2003). Durante el desarrollo de la presente Tesis no hemos confirmado la expresión de CORT ni en el páncreas ni en fracciones enriquecidas en islotes pancreáticos en cultivo, si bien pudimos comprobar su expresión en el hipotálamo de estos mismos animales (Córdoba-Chacón *et al.*, 2011c). Muy probablemente, la diferencia entre nuestros datos y los del grupo del Dr. Papotti reside en la diferente especie analizada así como en el diferente abordaje técnico.

En general y sobre los datos aportados en la presente Tesis, podemos concluir que la alteración observada en la expresión de SST y *sst2* reside en la ausencia de CORT.

1.1. Modulación del sistema SST a nivel pancreático por DIO.

La SST regula el metabolismo energético a distintos niveles. Así, se ha descrito su participación en la supresión de la ingesta de la comida y en la pérdida de peso en condiciones de obesidad (Stepanyan *et al.*, 2007; Tzotzas *et al.*, 2008). Del mismo modo, también se ha documentado que situaciones de estrés metabólico también regulan la expresión del sistema SST. En este sentido, se ha descrito un aumento significativo de la concentración de somatostatina circulante en ratones obesos y diabéticos (Strowski & Blake, 2008). Asimismo, también se ha descrito un aumento postprandial de la SST-28, de origen intestinal, de manera similar a como lo hace la

insulina y por tanto, participando en la regulación de la homeostasis de la glucosa (D'Alessio *et al.*, 1989).

Actualmente no existe ningún estudio en el que se haya documentado la modulación de la expresión de SST pancreática bajo condiciones de obesidad. En nuestro estudio, observamos que la expresión pancreática de SST no se ve afectada por la ingesta prolongada de una dieta rica en grasa. Además, la ausencia de CORT en animales obesos tampoco afecta a la expresión pancreática de SST. Por tanto, nuestros datos están en concordancia con lo descrito por otros autores sobre el aumento de SST circulante bajo situaciones de obesidad y que ésta se debe fundamentalmente a la producción de SST por el intestino (D'Alessio *et al.*, 1989). De manera similar, también hemos podido observar que la obesidad no afecta la expresión de los receptores sst3 y sst4, para los que hasta la fecha no se ha descrito ninguna implicación en la regulación de la función pancreática bajo condiciones metabólicas adversas (obesidad).

Por el contrario, hemos podido observar que la obesidad inducida por dieta modifica significativamente la expresión del receptor sst2. En este sentido, y como se mencionaba en el apartado anterior, es bien conocida la participación de sst2 en la acción inhibitoria de la SST sobre la producción de insulina y glucagón (Strowski *et al.*, 2000 ; Kailey *et al.*, 2012) y por tanto, su implicación o participación en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa, así como su relación con fenómenos de resistencia a insulina (Sutton *et al.*, 2009; Sotos-Prieto *et al.*, 2010). Además, en ratones obesos carentes de expresión de sst2 se ha descrito hiperglucemia e hiperglucagonemia (Singh *et al.*, 2007). Nuestros datos muestran un aumento significativo en la expresión de sst2 bajo condiciones de obesidad siendo éste más acusado cuanto más temprana fue la etapa del animal en el que se comenzó a administrar la dieta alta en grasa, lo cual coincide con lo previamente publicado sobre los efectos deletéreos de la obesidad cuando ésta es inducida en la etapa infantil sobre la etapa adulta (Juonala *et al.*, 2011).

En estrecha relación con lo anterior, la ausencia de CORT en animales obesos previno el aumento en la expresión del sst2 observada en animales WT obesos, sugiriendo un papel regulador de la CORT sobre la expresión de este receptor en condiciones metabólicas adversas, tal y como hemos documentado previamente bajo condiciones metabólicas normales. Por tanto, el conjunto de nuestros resultados apoya la importancia del receptor sst2 a nivel pancreático bajo situaciones de obesidad y el papel de la CORT en su regulación.

Por otro lado, revelamos por primera vez la presencia de los receptores truncados sst5 TMD1 y TMD2 en el páncreas de ratones, ya que hasta el momento únicamente se había descrito su presencia en hipotálamo e hipófisis de ratón (Córdoba-Chacón *et al.*, 2011b). Desde su

descubrimiento, la presencia de estos receptores ha estado íntimamente relacionada con el mal pronóstico de determinadas patologías. Así, en tumores de mama agresivos se ha descrito la expresión aumentada de uno de estos receptores y su correlación con marcadores de mal pronóstico (Durán-Prado *et al.*, 2010). En este sentido, en nuestro modelo de obesidad y dado que ésta es una situación patológica de inflamación crónica, hemos detectado una expresión aumentada del receptor sst5 TMD1 a nivel pancreático, de manera similar a lo documentado en hipófisis (Córdoba-Chacón *et al.*, 2011b). Por tanto, y de manera similar a lo que ocurre en otras patologías, la obesidad podría estar favoreciendo el *splicing* alternativo del gen del receptor sst5 generándose diferentes isoformas del mismo (sst5 TMD1) cuyo papel a nivel pancreático está aún por determinar.

1.2. Modulación del sistema SST a nivel pancreático bajo condiciones de ayuno.

En condiciones de ayuno, el nivel de glucosa en sangre se ve alterado y consecuentemente se produce una alteración en la liberación de las hormonas pancreáticas con objeto de mantener la homeostasis de la glucosa. Hasta el momento, no hay estudios que analicen la modulación de la expresión de la SST pancreática bajo situaciones de ayuno. A nivel hipotalámico se ha observado una disminución en el número de transcritos de SST, mientras que en el estómago o en la hipófisis no se han observado cambios significativos en su expresión (Luque *et al.*, 2007; Córdoba-Chacón *et al.*, 2011a). A nivel pancreático, hemos detectado una reducción significativa en el número de transcritos de SST en animales WT macho sometidos a 24 o 48h de ayuno, mientras que en animales hembra, la expresión de somatostatina tan solo aumenta tras un ayuno prolongado (48h). Como ha sido previamente propuesto, la expresión de SST es tejido y género dependiente (Córdoba-Chacón *et al.*, 2011a) lo cual explicaría la diferencia observada a nivel pancreático entre machos y hembras. En claro contraste con lo anterior, en nuestro diseño experimental de ayuno, los niveles de SST circulante no se vieron afectados (Córdoba-Chacón *et al.*, 2011a), lo cual se corresponde nuevamente con la mayor contribución de la producción de SST de origen gastrointestinal a la concentración de SST circulante (Corleto, 2010).

Por otro lado, también hemos podido comprobar que la expresión del receptor sst2 disminuyó significativamente en el páncreas de animales macho tras 24h de ayuno si bien, permaneció invariable durante periodos más prolongados. Esta disminución del número de transcritos de sst2 concuerdan con lo observado en otros tejidos (hipotálamo, hipófisis y estómago) y apoyan la implicación de sst2 en la homeostasis de la glucosa bajo condiciones de ayuno (Córdoba-Chacón *et al.*, 2011a). Sin embargo, en el páncreas de animales hembra no pudimos observar

cambios significativos en la expresión de *sst2* bajo estas mismas condiciones y por tanto, se requeriría la realización de nuevos estudios con objeto de establecer las bases de tal dimorfismo sexual.

Por último, y de manera general, la ausencia de CORT no parece afectar la expresión de SST y *sst2* mas allá de lo que lo hace una situación de ayuno *per se*, y por tanto, nuestros resultados no nos permiten obtener una conclusión sobre el posible papel pancreático de la CORT bajo esta condición metabólica extrema.

2. Sistema ghrelina a nivel pancreático.

La ghrelina, hormona producida fundamentalmente en el estómago, se expresa en diferentes localizaciones del organismo (Kojima *et al.*, 1999; Chancón *et al.*, 2012). A nivel pancreático, se ha descrito la expresión de los diferentes componentes del sistema ghrelina en las células beta, épsilon y otros tipos celulares endocrinos (Date *et al.*, 2002; Volante *et al.*, 2002; Wierup *et al.*, 2002; Prado *et al.*, 2004). Así, además de la bien caracterizada y descrita regulación de la función pancreática por la ghrelina de origen estomacal, también se ha descrito que la ghrelina local puede ejercer un papel sobre la función pancreática, y más concretamente sobre la homeostasis de la glucosa. Inicialmente, Dezaki y sus colaboradores sugirieron que la ghrelina local regulaba de forma paracrina la secreción de insulina (Dezaki *et al.*, 2006). Para ello, administraron un antagonista de GHS-R a animales gastrectomizados y observaron un aumento significativo en la secreción de insulina. Sin embargo, actualmente la acción local de la ghrelina sobre la regulación de la producción de insulina es objeto de controversia y debate. Incluso, Bando *et al.* 2012 han documentado que en animales transgénicos con sobreexpresión de ghrelina y GOAT, la ghrelina de origen pancreático no participa en la regulación de la liberación de insulina. Consecuentemente, el papel de la ghrelina de origen pancreático aún no se ha podido definir claramente.

En la presente Tesis Doctoral confirmamos la expresión de los diferentes componentes del sistema ghrelina (ghrelina, In1 ghrelina, GHS-R y GOAT) en nuestro modelo biológico: páncreas completo y fracciones enriquecidas en islotes pancreáticos obtenidas de animales WT y CORT-KO. Además, presentamos evidencias de la reducción que sufren los transcritos del receptor GHS-R y GOAT en ratones CORT-KO, lo cual *a priori* puede sugerir una posible regulación de las acciones de la ghrelina a nivel pancreático en este modelo animal.

Por otro lado y de manera similar a lo que se ha descrito a nivel hipotalámico e hipofisario (Kineman *et al.*, 2007), en el páncreas también observamos una expresión más abundante de la variante In1 ghrelina sobre la de la propia ghrelina, sugiriendo por tanto que la prevalencia a nivel pancreático de esta variante truncada ejercería diversas acciones biológicas a través de un receptor que está aún por identificar. Además, el análisis de la secuencia del transcrito In1 ghrelina revela que éste posee la secuencia característica de acilación u octanoilación descrita en el precursor pre-proghrelina y por tanto, a partir de él se podría generar un péptido que también podría convertirse en sustrato de la enzima GOAT (Kineman *et al.*, 2007; Gahete *et al.*, 2011). Así, basándonos en la expresión disminuida de GOAT en el páncreas de ratones CORT-KO, podemos sugerir que la CORT también podría regular la función pancreática de ghrelina o su variante In1 ghrelina mediante la modulación de su octanoilación/acilación y consecuentemente su activación, aspecto que necesitaría ser analizado en más detalle.

2.1. Modulación del sistema ghrelina en obesidad

En roedores, diferentes estudios han aportado evidencias sobre la modulación de los componentes del sistema ghrelina en condiciones metabólicas adversas como la obesidad (Baragli *et al.*, 2011; Aydin *et al.*, 2012). Concretamente, en condiciones de obesidad inducida por una dieta alta en grasa, se ha descrito una disminución significativa de los niveles de ghrelina a nivel gástrico, hipotálamo e hipofisario así como una concomitante reducción de la concentración plasmática de ghrelina (Kineman *et al.*, 2007; Luque *et al.*, 2007; Gahete *et al.*, 2010b). En nuestro estudio, y de manera similar a lo descrito, hemos comprobado que la expresión de determinados componentes del sistema ghrelina también se ve alterada a nivel pancreático en situaciones de obesidad inducida por la dieta. Sin embargo y de manera contraria a lo descrito en hipotálamo e hipófisis, en los que se ha documentado una disminución significativa de ghrelina, GOAT e In1 ghrelina (Gahete *et al.*, 2010b), hemos podido observar que la obesidad inducida por dieta produce una sobreexpresión de la regulación de ghrelina, In1 ghrelina y GHS-R en el páncreas de animales macho adultos, mientras que no altera la expresión de ninguno de los componentes del sistema ghrelina anteriormente mencionados en el páncreas de animales hembra. Nuestros resultados concuerdan con el carácter tejido-dependiente de las alteraciones en el sistema ghrelina bajo condiciones de obesidad, y además también podrían sugerir que los cambios observados en los componentes del sistema ghrelina son género-dependientes. Por otro lado, bajo estas mismas condiciones experimentales (obesidad), hemos documentado previamente que la concentración de ghrelina circulante no se ve alterada en estos animales (Gahete *et al.*, 2010b), confirmando así que el aumento de ghrelina circulante observado en situaciones de obesidad se debe fundamentalmente a la síntesis de ghrelina de origen gástrico (Gahete *et al.*, 2010b; Sahin *et al.*, 2011).

Por otro lado, la obesidad ha sido ampliamente documentada como una situación de inflamación crónica que, específicamente a nivel pancreático, causa un efecto deletéreo sobre su función y particularmente sobre la función de la célula beta. En este sentido, el aumento observado en la expresión de ghrelina pancreática bajo situaciones de obesidad podría estar actuando como un mecanismo protector mediante la modulación del crecimiento y supervivencia de la célula beta-pancreática, de manera similar a lo recientemente descrito para los diferentes componentes del sistema ghrelina (ghrelina, desacil ghrelina, obestatina, etc) bajo condiciones fisiológicas y patofisiológicas (Granata 2006). Además, en situaciones metabólicas extremas, hemos observado que la expresión de la variante In1 ghrelina también predomina sobre la de la propia ghrelina, apoyando por tanto la relevancia de un papel para esta isoforma que contribuiría al descrito para los péptidos relacionados con la ghrelina sobre la supervivencia de la célula beta (Granata *et al.*, 2012b).

Recientemente, nuestro grupo ha descrito que la acumulación de grasa y la homeostasis de la glucosa en los ratones de la estirpe C57Bl/6 es independiente de la edad en la que al animal se le administre una dieta HFD (Córdoba-Chacón *et al.*, 2012b) si bien, el perjuicio fisiológico o el efecto deletéreo de la obesidad es mayor cuanto más temprana es la edad en la que ésta se induce (Juonala *et al.*, 2011). En la presente tesis hemos analizado cómo la obesidad inducida por dieta podría afectar la expresión pancreática del sistema ghrelina cuando ésta era inducida a diferentes edades del animal (joven vs. adulto) así como su diferente duración de inducción (10 vs. 38 semanas). Mediante esta aproximación, hemos observado que la expresión los diferentes componentes del sistema ghrelina no se ve básicamente alterada cuando la obesidad se induce en etapas tempranas (jóvenes). Sin embargo, y tan solo en el caso de animales macho, observamos un aumento en la expresión de GHS-R en respuesta a la obesidad.

En contraposición a la sobreexpresión del sistema ghrelina descrita anteriormente en el páncreas de animales WT, hemos observado una disminución significativa de los componentes del sistema ghrelina en el páncreas completo así como en fracciones enriquecidas de islotes pancreáticos en animales obesos y deficientes en CORT. Estos resultados apoyarían un nuevo papel patofisiológico de la CORT en la función pancreática bajo situaciones de estrés metabólico (obesidad) confirmando además la interrelación previamente descrita para los sistemas ghrelina y cortistatina (Broglia *et al.*, 2002; Chanclón *et al.*, 2012). Paradójicamente, en fracciones de islotes obtenidas del páncreas de animales CORT-KO obesos observamos una expresión aumentada en el nivel de transcritos de la variante In1, cuyo *splicing* podría estar favorecido sobre la expresión de ghrelina nativa en estas situaciones de cultivo, a través de un mecanismo no del todo claro aún. Evidentemente, nuestros resultados sugieren que tanto la expresión de la ghrelina nativa y su variante In1 ghrelina podría estar regulada de manera diferencial en islotes pancreáticos en cultivo de una manera semejante a los descrito en hipotálamo, hipófisis y estómago (Córdoba-Chacón *et al.*, 2011a), aspecto que necesita ser investigado con mayor profundidad.

2.2. Modulación del sistema ghrelina en el páncreas en condiciones de ayuno

En situaciones de ayuno, se ha descrito que la expresión de ghrelina no se ve significativamente modificada a nivel de estómago o hipotálamo de ratón mientras que a nivel hipofisario se ha descrito un aumento de su expresión (Luque *et al.*, 2006b; Luque *et al.*, 2007). A nivel pancreático, nuestro estudio es el primero que analiza la expresión de los diferentes componentes del sistema ghrelina, y de manera similar a lo descrito en hipotálamo y estómago, hemos podido comprobar que el sistema ghrelina tampoco se ve alterado bajo circunstancias de

déficit nutricional. Nuestros resultados sugieren que el sistema ghrelina no participa en la desregulación de la función pancreática bajo situaciones de ayuno. Los niveles circulantes de ghrelina total no sufren cambios significativos tras 24 o 48 h de ayuno de ayuno, mientras que la concentración plasmática de ghrelina acilada aumentó significativamente y de manera similar a lo descrito en otros estudios (Luque *et al.*, 2006b; Luque *et al.*, 2007; Gahete *et al.*, 2010b).

En el caso particular de animales hembra, la ausencia de cortistatina (CORT-KO) está relacionada con una mayor concentración plasmática de ghrelina total y acilada en comparación con los animales de genotipo silvestre (WT), aumento que además se corresponde con un incremento en la expresión de los transcritos de ghrelina a nivel estómago (Córdoba-Chacón *et al.*, 2011c). A nivel pancreático, y de manera similar a lo anteriormente descrito, hemos observado un aumento significativo en la expresión de ghrelina en animales hembra CORT-KO sometidos a ayuno prolongado (48h) si bien, estos datos necesitan un análisis más profundo con objeto de determinar su posible relevancia en situaciones de ayuno.

3. **Insulina y otras hormonas pancreáticas a nivel pancreático.**

Con el fin de profundizar en el conocimiento sobre el papel de la CORT en la función pancreática, evaluamos la expresión de los transcritos de insulina y glucagón en animales WT y CORT-KO. Nuestros datos demuestran que la ausencia de CORT no modifica el nivel de transcritos de estas hormonas pancreáticas. Además, hemos podido comprobar que la reintroducción sistémica de CORT mediante bombas durante un periodo de 7 días, tampoco modifica la expresión de insulina o glucagón. Estos resultados coinciden con lo recientemente publicado por nuestro grupo sobre que la ausencia de CORT no altera los niveles circulantes de insulina y glucagón (Córdoba-Chacón *et al.*, 2011c). En este contexto, la concentración de glucosa circulante tampoco se vio alterada en ratones CORT-KO en comparación con sus respectivos controles (WT). Sin embargo, y en el caso particular de ratones CORT-KO macho, nuestro grupo ha descrito recientemente un carácter insulino-resistente de los mismos (Córdoba-Chacón *et al.*, 2011c). Así, las pruebas de tolerancia a la insulina realizadas sobre animales CORT-KO macho, revelaron un aumento en la concentración de glucosa a los 60 y 120 min después de la administración de insulina. En estos mismo animales, también se ha descrito un aumento significativo en los niveles plasmáticos de GH y corticosterona, hormonas con acción bien conocida sobre la señalización de insulina (Byrne, 2001) y que por tanto, podrían estar contribuyendo en la resistencia a insulina característica de los animales CORT-KO macho (Córdoba-Chacón *et al.*, 2011c). En claro contraste con lo anterior, en animales CORT-KO hembra, se han descrito niveles aumentados de ghrelina acilada circulante que podrían contribuir en el mantenimiento de la función pancreática y homeostasis de la glucosa mediante su acción sobre la célula beta y evitando consecuentemente la resistencia a insulina que presentan los animales CORT-KO macho, aspecto que indudablemente necesitaría ser investigado mediante un estudio más profundo. No obstante, nuestros sobre datos de la expresión disminuida a nivel pancreático de determinados componentes del sistema ghrelina (GHS-R y GOAT) en animales CORT-KO machos, y no en la hembra, podrían contribuir en el esclarecimiento de dicha hipótesis.

El número de estudios realizados *in vivo* que describen el papel de la CORT sobre la función pancreática es muy limitado. Por lo general, a la CORT se le atribuye una acción de carácter inhibitorio sobre la secreción de insulina *in vivo* y bajo determinadas circunstancias patológicas (Broglio *et al.*, 2002; Grottoli *et al.*, 2006), de manera similar a lo originalmente descrito para la SST (Alberti *et al.*, 1973), ampliamente considerada como su análogo natural. Sin embargo, se ha documentado que la ausencia de SST (SST-KO) tampoco modifica la concentración plasmática de insulina o glucagón (Luque *et al.*, 2006; Luque *et al.*, 2007), muy probablemente

debido a acciones compensatorias sobre la función pancreática ejercidas por otros factores circulantes.

De manera interesante, nuestros estudios *in vitro* sobre islotes pancreáticos en cultivo y obtenidas de animales CORT-KO, revelan una reducción significativa en el número de transcritos de insulina y glucagón. Además hemos podido observar un incremento en la expresión de sst2 y una reducción en la expresión de GHS-R en comparación con los islotes obtenidos de animales WT. Muy probablemente, *in vitro*, la expresión reducida de insulina y glucagón podría deberse a la acción inhibitoria de la SST sobre la expresión de las mismas a través de su acoplamiento al receptor sst2, al cual le ha sido ampliamente asignado el carácter inhibitorio de la somatostatina sobre las secreciones endocrinas (Strowski *et al.*, 2000 ; Kailey *et al.*, 2012).

Por otro lado, hemos podido comprobar que la administración *in vitro* de CORT a fracciones enriquecidas en islotes pancreáticos procedente de animales WT, provocaba un aumento significativo en el número de transcritos de insulina. Sin embargo, este mismo tratamiento a islotes obtenidos de animales CORT-KO no alteraba significativamente el número de transcritos de insulina, si bien éstos presentaron una clara tendencia a disminuir. Como indicábamos en el párrafo anterior, la expresión de GHS-R es mayor en islotes procedentes de animales WT que en CORT-KO y por tanto, el papel estimulador de la CORT sobre la síntesis de insulina podría deberse a su acción a través del receptor de ghrelina, al que se une con una alta afinidad (Deghenghi *et al.*, 2001).

El conjunto de nuestros resultados revela que la CORT puede ejercer una acción dual sobre la expresión de insulina, de carácter inhibitorio (Strowski *et al.*, 2000) o estimulador (Kailey *et al.*, 2012), dependiendo de la acción se ejerce a través del receptor sst2 o GHS-R, respectivamente.

3.1. Modulación de insulina y glucagón en el páncreas en DIO.

En situaciones de obesidad inducida por dieta hemos detectado un aumento significativo de los transcritos de insulina 1 e insulina 2 en extractos de páncreas, mientras que en extractos de fracciones enriquecidas en islotes tan solo hemos detectado un aumento significativo de transcritos de insulina 2. Tal aumento en los transcritos de insulina se corresponde con un aumento en la concentración de insulina plasmática en animales obesos tal como observamos en este estudio y los realizados por otros (Luque *et al.*, 2011; Granata *et al.*, 2012a). Sin embargo, en el páncreas de animales carentes en CORT y obesos, el nivel de transcritos de insulina

permanece en el mismo rango que los animales control, si bien están ligeramente disminuidos en muestras de islotes pancreáticos, sugiriendo y apoyando el papel de la cortistatina endógena en la regulación de la función pancreática endocrina, particularmente sobre la célula beta pancreática.

La obesidad inducida por la dieta, bien inducida desde la etapa adulta o desde edades más tempranas, provoca la aparición de fenómenos de hiperinsulinemia, hiperglucemia y resistencia a la insulina en estos animales (Córdoba-Chacón *et al.*, 2012b). Así, en situaciones de diabetes, la sobreproducción de insulina para contrarrestar los altos niveles de glucosa en sangre termina provocando de manera paulatina la muerte de la célula beta pancreática. Teniendo en cuenta que la ghrelina promueve la supervivencia y proliferación de las células beta pancreáticas en condiciones metabólicas extremas (glucolipotoxicidad), el aumento de su expresión observado en los machos obesos a nivel pancreático podría explicarse mediante su papel protector sobre la célula productora de insulina (Granata *et al.*, 2007; Granata *et al.*, 2012b).

Por el contrario, la falta de CORT previno el aumento en los transcritos de insulina observado en animales WT obesos al igual que lo descrito para el sistema ghrelina, así como tampoco en los niveles circulantes de insulina. Estos datos sugieren que la CORT endógena podría jugar un papel importante en la prevención de situaciones patológicas tales como obesidad y diabetes. Los mecanismos de la regulación metabólica a nivel pancreático por los que actuaría la CORT son aún desconocidos, sin embargo los datos aportados en la presente Tesis Doctoral nos permitirían sugerir la implicación de los receptores sst2 y GHS-R.

3.2. Modulación de insulina y glucagón en el páncreas en condiciones de ayuno.

Ha sido ampliamente descrito que ante un bajada de los niveles de glucosa en sangre, el páncreas contribuye con una mayor producción de glucagón y una reducción concomitante de la liberación de insulina, con objeto de restablecer un nivel glucosa óptimo o el estado de normoglucemia en el organismo (Boyle *et al.*, 1989). En nuestro estudio, el análisis realizado sobre la expresión de insulina y glucagón bajo condiciones de ayuno confirma un aumento en el número de transcritos de glucagón mientras que los de insulina disminuyen. Concretamente, en animales WT macho, el número de transcritos de glucagón aumentó tras 24 y 48 horas de ayuno, mientras que en animales WT hembra aumentó tras 48 horas de ayuno. En el caso de la insulina, ésta disminuyó su expresión en las hembras tras 24 o 48 horas, mientras que en machos la expresión de insulina permaneció invariable.

Con el fin de estudiar la implicación de la CORT en la función pancreática bajo condiciones de ayuno, analizamos la expresión pancreática de insulina y glucagón en ratones de genotipo CORT-KO. De este modo, pudimos comprobar que la ausencia de CORT no alteraba los cambios en los niveles de insulina observados en animales WT sometidos a ayuno, dejando a un lado la interferencia de la CORT en la función pancreática en la alteración metabólica causada por el ayuno.

Conclusiones

1. La expresión constitutiva de SST y su receptor sst2 se ve alterada a nivel pancreático por la ausencia de CORT así como bajo determinadas situaciones metabólicas adversas (ayuno y obesidad).
5. La expresión pancreática del sistema ghrelina aumenta significativamente en condiciones de obesidad inducida por dieta a nivel pancreático.
6. La ausencia de CORT endógena previene la sobreexpresión de los componentes del sistema ghrelina a nivel pancreático.
7. La ausencia de CORT endógena previene o impide la elevada secreción de insulina (síntesis y liberación) que es característica de situaciones de obesidad, lo cual sugiere que la CORT endógena puede jugar un papel relevante en la función pancreática en situaciones normales y pato-fisiológicas.

Conclusions

1. Constitutive expression of SST and its receptor sst2 is altered at the pancreatic level by the absence of CORT as well as under certain adverse metabolic situations (fasting and obesity).
2. Pancreatic expression of ghrelin system increases significantly in terms of diet-induced obesity at the pancreatic level.
3. Absence of endogenous CORT prevents the pancreatic over-expression of ghrelin system components.
4. Absence of endogenous CORT prevents the high secretion of insulin (synthesis and release) that is characteristic of obesity situations, suggesting that endogenous CORT may play a relevant role in pancreatic function in normal and patho-physiological situations.

Bibliografía

- ADEGHATE, E. & PONERY, A. S. (2002). Ghrelin Stimulates Insulin Secretion from the Pancreas of Normal and Diabetic Rats. *Journal of Neuroendocrinology* **14**, 555-560.
- AL MASSADI, O., TSCHÖP, M. H. & TONG, J. (2011). Ghrelin acylation and metabolic control. *Peptides* **32**, 2301-2308.
- ALBERTI, K. G. M. M., JUEL CHRISTENSEN, N., ENKJÆR CHRISTENSEN, S., PRANGE HANSEN, A., IVERSEN, J., LUNDBÆK, K., SEYER-HANSEN, K. & ORSKOV, H. (1973). Inhibition of insulin secretion by somatostatin. *The Lancet* **302**, 1299-1301.
- ALLIA, E., TARABRA, E., VOLANTE, M., CERRATO, M., GHIGO, E., MUCCIOLI, G. & PAPOTTI, M. (2005). Expression of cortistatin and MrgX2, a specific cortistatin receptor, in human neuroendocrine tissues and related tumours. *The Journal of Pathology* **207**, 336-345.
- AN, W., LI, Y., XU, G., ZHAO, J., XIANG, X., DING, L., LI, J., GUAN, Y., WANG, X., TANG, C., LI, X., MULHOLLAND, M. & ZHANG, W. (2010). Modulation of Ghrelin O-Acyltransferase Expression in Pancreatic Islets. *Cellular Physiology and Biochemistry* **26**, 707-716.
- ANGELIDIS, G., VALOTASSIOU, V. & GEORGOULIAS, P. (2010). Current and potential roles of ghrelin in clinical practice. *Journal of endocrinological investigation* **33**, 823-838.
- ASAKAWA, A., INUI, A., FUJIMIYA, M., SAKAMAKI, R., SHINFUKU, N., UETA, Y., MEGUID, M. M. & KASUGA, M. (2005). Stomach regulates energy balance via acylated ghrelin and desacyl ghrelin. *Gut* **54**, 18-24.
- AYDIN, S., SAHIN, İ., OZKAN, Y., DAG, E., GUNAY, A., GUZEL, S., CATAK, Z. & OZERCAN, M. (2012). Examination of the tissue ghrelin expression of rats with diet-induced obesity using radioimmunoassay and immunohistochemical methods. *Molecular and Cellular Biochemistry* **365**, 165-173.
- BANDO, M., IWAKURA, H., ARIYASU, H., HOSODA, H., YAMADA, G., HOSODA, K., ADACHI, S., NAKAO, K., KANGAWA, K. & AKAMIZU, T. (2012). Transgenic overexpression of intraislet ghrelin does not affect insulin secretion or glucose metabolism in vivo. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism* **302**, E403-E408.
- BARAGLI, A., LANFRANCO, F., ALLASIA, S., GRANATA, R. & GHIGO, E. (2011). Neuroendocrine and metabolic activities of ghrelin gene products. *Peptides* **32**, 2323-2332.
- BARNETT, B. F.-H., YOUSANG, HWANG, Y. F.-T., MARTIN S., TAYLOR, M. F.-K., HENRIETTE, KIRCHNER, H. F.-P., PAUL T., PFLUGER, P. F.-B., VINCENT, BERNARD, V. F.-L., YU-YI, LIN, Y. F.-B., ERIN M., BOWERS, E. F.-M., CHANDRANI, MUKHERJEE, C. F.-S., WOO-JIN, SONG, W. F.-L., PATTI A., LONGO, P. F.-L., DANIEL J., LEAHY, D. F.-H., MEHBOOB A., HUSSAIN, M. F.-T., MATTHIAS H., TSCHOP, M. F.-B., JEF D., BOEKE, J. F.-C., PHILIP A. & COLE, P. A. (2010). Glucose and weight control in mice with a designed ghrelin O-acyltransferase inhibitor. *Science* **330**, 1689-1692. .
- BENSO A, G. C., PRODAM F, GAUNA C, DESTEFANIS S, FILTRI L, VAN DER LELY AJ, DEGHENGI R, GHIGO E, BROGLIO F. (2003). Effects of cortistatin-14 and somatostatin-14 on the endocrine response to hexarelin in humans. *J Endocrinol Invest.* **26**, 599-603.

- BOEHM, B. O. & LUSTIG, R. H. (2002). Use of somatostatin receptor ligands in obesity and diabetic complications. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* **16**, 493-509.
- BOYLE, P. J., SHAH, S. D. & CRYER, P. E. (1989). Insulin, glucagon, and catecholamines in prevention of hypoglycemia during fasting. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism* **256**, E651-E661.
- BRAZEAU, P., VALE, W., BURGUS, R., LING, N., BUTCHER, M., RIVIER, J. & GUILLEMIN, R. (1973). Hypothalamic Polypeptide That Inhibits the Secretion of Immunoreactive Pituitary Growth Hormone. *Science* **179**, 77-79.
- BRIGGS, D. & ANDREWS, Z. (2011). A Recent Update on the Role of Ghrelin in Glucose Homeostasis. *Current Diabetes Reviews* **7**, 201-207.
- BROGLIO, F., ARVAT, E., BENSO, A., GOTTERO, C., MUCCIOLI, G., PAPOTTI, M., LELY, A. J. V. D., DEGHENGI, R. & GHIGO, E. (2001). Ghrelin, a Natural GH Secretagogue Produced by the Stomach, Induces Hyperglycemia and Reduces Insulin Secretion in Humans. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **86**, 5083.
- BROGLIO, F., ARVAT, E., BENSO, A., GOTTERO, C., PRODAM, F., GROTTOLI, S., PAPOTTI, M., MUCCIOLI, G., VAN DER LELY, A. J., DEGHENGI, R. & GHIGO, E. (2002). Endocrine Activities of Cortistatin-14 and Its Interaction with GHRH and Ghrelin in Humans. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **87**, 3783-3790.
- BROGLIO, F., GOTTERO, C., ARVAT, E. & GHIGO, E. (2003). Endocrine and non-endocrine actions of ghrelin. *Horm Res* **59**, 109-117.
- BROGLIO, F., GOTTERO, C., PRODAM, F., GAUNA, C., MUCCIOLI, G., PAPOTTI, M., ABRIBAT, T., VAN DER LELY, A. J. & GHIGO, E. (2004). Non-Acylated Ghrelin Counteracts the Metabolic But Not the Neuroendocrine Response to Acylated Ghrelin in Humans. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **89**, 3062-3065.
- BROGLIO, F., GROTTOLI, S., ARVAT, E. & GHIGO, E. (2008). Endocrine actions of cortistatin: In vivo studies. *Molecular and Cellular Endocrinology* **286**, 123-127.
- BYRNE, C. D. (2001). Programming other hormones that affect insulin: Type 2 diabetes. *British Medical Bulletin* **60**, 153-171.
- CABRERA, O., BERMAN, D., KENYON, N. S., RICORDI, C., BERGGREN, P. & CAICEDO, A. (2006). The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 2334-2339.
- COLOMBO, M., GREGERSEN, S., XIAO, J. & HERMANSEN, K. (2003). Effects of Ghrelin and Other Neuropeptides (CART, MCH, Orexin A and B, and GLP-1) on the Release of Insulin From Isolated Rat Islets. *Pancreas* **27**, 161-166.
- CORDIDO, F., ISIDRO, M. L., NEMINA, R. & SANGIAO-ALVARELLOS, S. (2009). Ghrelin and Growth Hormone Secretagogues, Physiological and Pharmacological Aspect. *Current Drug Discovery Technologies* **6**, 34-42.

- CORDIDO, F., PEÑALVA, A., DIEGUEZ, C. & CASANUEVA, F. F. (1993). Massive growth hormone (GH) discharge in obese subjects after the combined administration of GH-releasing hormone and GHRP-6: evidence for a marked somatotroph secretory capability in obesity. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **76**, 819-823.
- CÓRDOBA-CHACÓN, GAHETE, CULLER, CASTAÑO, K., R. D. & LUQUE. (2012a). Somatostatin Dramatically Stimulates Growth Hormone Release from Primate Somatotrophs Acting at Low Doses Via Somatostatin Receptor 5 and Cyclic AMP. *Journal of Neuroendocrinology* **24**, 453-463.
- CÓRDOBA-CHACÓN, G., MANUEL, DURAN-PRADO, POZO-SALAS, MALAGÓN, GRACIA-NAVARRO, KINEMAN, LUQUE & CASTAÑO. (2010). Identification and characterization of new functional truncated variants of somatostatin receptor subtype 5 in rodents. *Cellular and Molecular Life Sciences* **67**, 1147-1163.
- CÓRDOBA-CHACÓN, J., GAHETE, M., POZO-SALAS, A. I., MORENO-HERRERA, A., CASTAÑO, J. P., KINEMAN, R. D. & LUQUE, R. M. (2012b). Peripubertal-onset, but not adult-onset, obesity increases IGF-I and drives development of lean mass, which may lessen the metabolic impairment in adult obesity. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism*.
- CÓRDOBA-CHACÓN, J., GAHETE, M. D., CASTAÑO, J. P., KINEMAN, R. D. & LUQUE, R. M. (2011a). Somatostatin and its receptors contribute in a tissue-specific manner to the sex-dependent metabolic (fed/fasting) control of growth hormone axis in mice. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism* **300**, E46-E54.
- CÓRDOBA-CHACÓN, J., GAHETE, M. D., DURÁN-PRADO, M., LUQUE, R. M. & CASTAÑO, J. P. (2011b). Truncated somatostatin receptors as new players in somatostatin–cortistatin pathophysiology. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1220**, 6-15.
- CÓRDOBA-CHACÓN, J., GAHETE, M. D., POZO-SALAS, A., MARTÍNEZ-FUENTES, A., DE LECEA, L., GRACIA-NAVARRO, F., KINEMAN, R., CASTAÑO, J. P. & LUQUE, R. M. (2011c). Cortistatin Is Not a Somatostatin Analogue but Stimulates Prolactin Release and Inhibits GH and ACTH in a Gender-Dependent Fashion: Potential Role of Ghrelin. *Endocrinology* **152**, 4800-4812.
- CORLETO, V. D. (2010). Somatostatin and the gastrointestinal tract. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity* **17**, 63-68.
- CSABA, Z., BERNARD, V., HELBOE, L., BLUET-PAJOT, M.-T., BLOCH, B., EPELBAUM, J. & DOURNAUD, P. (2001). In Vivo Internalization of the Somatostatin sst2A Receptor in Rat Brain: Evidence for Translocation of Cell-Surface Receptors into the Endosomal Recycling Pathway. *Molecular and Cellular Neuroscience* **17**, 646-661.
- CUMMINGS, D. E., OVERDUIN, J., SHANNON, M. H. & FOSTER-SCHUBERT, K. E. (2005). Hormonal mechanisms of weight loss and diabetes resolution after bariatric surgery. *Surgery for Obesity and Related Diseases* **1**, 358-368.
- CHANCLÓN, B., MARTÍNEZ-FUENTES, A. J. & GRACIA-NAVARRO, F. (2012). Role of SST, CORT and Ghrelin and its receptors at the endocrine pancreas. *Frontiers in Endocrinology* **3**.

- CHUANG, J., SAKATA, I., KOHNO, D., PERELLO, M., OSBORNE-LAWRENCE, S., REPA, J. J. & ZIGMAN, J. M. (2011). Ghrelin Directly Stimulates Glucagon Secretion from Pancreatic alpha-Cells. *Molecular Endocrinology* **25**, 1600-1611.
- D'ALESSIO, D. A., SIEBER, C., BEGLINGER, C. & ENSINCK, J. W. (1989). A physiologic role for somatostatin 28 as a regulator of insulin secretion. *The Journal of Clinical Investigation* **84**, 857-862.
- DATE, Y., KOJIMA, M., HOSODA, H., SAWAGUCHI, A., MONDAL, M. S., SUGANUMA, T., MATSUKURA, S., KANGAWA, K. & NAKAZATO, M. (2000). Ghrelin, a Novel Growth Hormone-Releasing Acylated Peptide, Is Synthesized in a Distinct Endocrine Cell Type in the Gastrointestinal Tracts of Rats and Humans. *Endocrinology* **141**, 4255-4261.
- DATE, Y., NAKAZATO, M., HASHIGUCHI, S., DEZAKI, K., MONDAL, M. S., HOSODA, H., KOJIMA, M., KANGAWA, K., ARIMA, T., MATSUO, H., YADA, T. & MATSUKURA, S. (2002). Ghrelin is present in pancreatic cells of humans and rats and stimulates insulin secretion. *Diabetes* **51**, 124-129.
- DAVIES, J. S., KOTOKORPI, P., ECCLES, S. R., BARNES, S. K., TOKARCZUK, P. F., ALLEN, S. K., WHITWORTH, H. S., GUSCHINA, I. A., EVANS, B. A. J., MODE, A., ZIGMAN, J. M. & WELLS, T. (2009). Ghrelin Induces Abdominal Obesity Via GHS-R-Dependent Lipid Retention. *Molecular Endocrinology* **23**, 914-924.
- DE LECEA, L. & CASTANO, J. P. (2006). Cortistatin: not just another somatostatin analog. **2**, 356-357.
- DE LECEA, L. & CASTAÑO, J. P. (2006). Cortistatin: not just another somatostatin analog. *Nat Clin Pract End Met* **2**, 356-357.
- DE LECEA, L., CRIADO, J. R., PROSPERO-GARCIA, O., GAUTVIK, K. M., SCHWEITZER, P., DANIELSON, P. E., DUNLOP, C. L. M., SIGGINS, G. R., HENRIKSEN, S. J. & SUTCLIFFE, J. G. (1996). A cortical neuropeptide with neuronal depressant and sleep-modulating properties. **381**, 242-245.
- DE LECEA L, S. J. (1996). Peptides, sleep and cortistatin. *Mol Psychiatry*. **1**, 349-351.
- DEGHENGI, R., PAPOTTI, M., GHIGO, E. & MUCCIOLI, G. (2001). Cortistatin, but not somatostatin, binds to growth hormone secretagogue (GHS) receptors of human pituitary gland. *J Endocrinol Invest*. **24**, RC1-3.
- DEGHENGI R, P. M., GHIGO E, MUCCIOLI G. (2001). Cortistatin, but not somatostatin, binds to growth hormone secretagogue (GHS) receptors of human pituitary gland. *J Endocrinol Invest*. **24**, RC1-3.
- DEZAKI, K., HOSODA, H., KAKEI, M., HASHIGUCHI, S., WATANABE, M., KANGAWA, K. & YADA, T. (2004). Endogenous Ghrelin in Pancreatic Islets Restricts Insulin Release by Attenuating Ca²⁺ Signaling in β -Cells. *Diabetes* **53**, 3142-3151.
- DEZAKI, K., KAKEI, M. & YADA, T. (2007). Ghrelin Uses G α 2 and Activates Voltage-Dependent K⁺ Channels to Attenuate Glucose-Induced Ca²⁺ Signaling and Insulin Release in Islet β -Cells. *Diabetes* **56**, 2319-2327.

- DEZAKI, K., SONE, H., KOIZUMI, M., NAKATA, M., KAKEI, M., NAGAI, H., HOSODA, H., KANGAWA, K. & YADA, T. (2006). Blockade of Pancreatic Islet-Derived Ghrelin Enhances Insulin Secretion to Prevent High-Fat Diet-Induced Glucose Intolerance. *Diabetes* **55**, 3486-3493.
- DEZAKI, K., SONE, H. & YADA, T. (2008). Ghrelin is a physiological regulator of insulin release in pancreatic islets and glucose homeostasis. *Pharmacology & Therapeutics* **118**, 239-249.
- DOURNAUD, P., DELAERE, P., HAUW, J. J. & EPELBAUM, J. (1995). Differential correlation between neurochemical deficits, neuropathology, and cognitive status in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* **16**, 817-823.
- DURAN-PRADO, M., GAHETE, M. D., HERGUETA-REDONDO, M., MARTINEZ-FUENTES, A. J., CORDOBA-CHACON, J., PALACIOS, J., GRACIA-NAVARRO, F., MORENO-BUENO, G., MALAGON, M. M., LUQUE, R. M. & CASTANO, J. P. (2012). The new truncated somatostatin receptor variant sst5TMD4 is associated to poor prognosis in breast cancer and increases malignancy in MCF-7 cells. *Oncogene* **31**, 2049-2061.
- DURÁN-PRADO, M., GAHETE, M. D., MARTÍNEZ-FUENTES, A. J., LUQUE, R. M., QUINTERO, A., WEBB, S. M., BENITO-LÓPEZ, P., LEAL, A., SCHULZ, S., GRACIA-NAVARRO, F., MALAGÓN, M. M. & CASTAÑO, J. P. (2009). Identification and Characterization of Two Novel Truncated but Functional Isoforms of the Somatostatin Receptor Subtype 5 Differentially Present in Pituitary Tumors. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **94**, 2634-2643.
- DURÁN-PRADO, M., SAVEANU, A., LUQUE, R. M., GAHETE, M. D., GRACIA-NAVARRO, F., JAQUET, P., DUFOUR, H., MALAGÓN, M. M., CULLER, M. D., BARLIER, A. & CASTAÑO, J. P. (2010). A Potential Inhibitory Role for the New Truncated Variant of Somatostatin Receptor 5, sst5TMD4, in Pituitary Adenomas Poorly Responsive to Somatostatin Analogs. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **95**, 2497-2502.
- ECKEL, R. H., KAHN, S. E., FERRANNINI, E., GOLDFINE, A. B., NATHAN, D. M., SCHWARTZ, M. W., SMITH, R. J. & SMITH, S. R. (2011). Obesity and Type 2 Diabetes: What Can Be Unified and What Needs to Be Individualized? *Diabetes Care* **34**, 1424-1430.
- EGIDO, E., RODRIGUEZ-GALLARDO, J., SILVESTRE, R. & MARCO, J. (2002). Inhibitory effect of ghrelin on insulin and pancreatic somatostatin secretion. *European Journal of Endocrinology* **146**, 241-244.
- EGIDO, E. M., HERNÁNDEZ, R., MARCO, J. & SILVESTRE, R. A. (2009). Effect of obestatin on insulin, glucagon and somatostatin secretion in the perfused rat pancreas. *Regulatory Peptides* **152**, 61-66.
- EHSES, J. A., PERREN, A., EPPLER, E., RIBAU, P., POSPISILIK, J. A., MAOR-CAHN, R., GUERPEL, X., ELLINGSGAARD, H., SCHNEIDER, M. K. J., BIOLLAZ, G., FONTANA, A., REINECKE, M., HOMODELARCHE, F. & DONATH, M. Y. (2007). Increased Number of Islet-Associated Macrophages in Type 2 Diabetes. *Diabetes* **56**, 2356-2370.
- ENGELKING. (1997). Physiology of the endocrine pancreas. *Semin Vet Med Surg (Small Anim)*. **4**, 224-229.

- EPELBAUM, J., GUILLOU, J.-L., GASTAMBIDE, F., HOYER, D., DURON, E. & VIOLLET, C. (2009). Somatostatin, Alzheimer's disease and cognition: An old story coming of age? *Progress in Neurobiology* **89**, 153-161.
- ESLER, W. P., RUDOLPH, J., CLAUS, T. H., TANG, W., BARUCCI, N., BROWN, S.-E., BULLOCK, W., DALY, M., DECARR, L., LI, Y., MILARDO, L., MOLSTAD, D., ZHU, J., GARDELL, S. J., LIVINGSTON, J. N. & SWEET, L. J. (2007). Small-Molecule Ghrelin Receptor Antagonists Improve Glucose Tolerance, Suppress Appetite, and Promote Weight Loss. *Endocrinology* **148**, 5175-5185.
- FELDMANN, B., JEHLE, P. M., MOHAN, S., LANG, G. E., LANG, G. K., BRUECKEL, J. & BOEHM, B. O. (2000). Diabetic retinopathy is associated with decreased serum levels of free IGF-I and changes of IGF-binding proteins. *Growth Hormone & IGF Research* **10**, 53-59.
- FLOOD, J. F., UEZU, K. & MORLEY, J. E. (1997). The cortical neuropeptide, cortistatin-14, impairs post-training memory processing. *Brain Research* **775**, 250-252.
- FURUTA, M., FUNABASHI, T. & KIMURA, F. (2001). Intracerebroventricular Administration of Ghrelin Rapidly Suppresses Pulsatile Luteinizing Hormone Secretion in Ovariectomized Rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **288**, 780-785.
- GAHETE, M. D., CORDOBA-CHACÓN, J., DURAN-PRADO, M., MALAGÓN, M. A. M., MARTINEZ-FUENTES, A. J., GRACIA-NAVARRO, F., LUQUE, R. M. & CASTAÑO, J. P. (2010a). Somatostatin and its receptors from fish to mammals. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1200**, 43-52.
- GAHETE, M. D., CORDOBA-CHACÓN, J., HERGUETA-REDONDO, M., MARTÍNEZ-FUENTES, A. J., KINEMAN, R. D., MORENO-BUENO, G., LUQUE, R. M. & CASTAÑO, J. P. (2011). A Novel Human Ghrelin Variant (In1-Ghrelin) and Ghrelin-O-Acyltransferase Are Overexpressed in Breast Cancer: Potential Pathophysiological Relevance. *PLoS ONE* **6**, e23302.
- GAHETE, M. D., CORDOBA-CHACÓN, J., SALVATORI, R., CASTAÑO, J. P., KINEMAN, R. D. & LUQUE, R. M. (2010b). Metabolic regulation of ghrelin O-acyl transferase (GOAT) expression in the mouse hypothalamus, pituitary, and stomach. *Molecular and Cellular Endocrinology* **317**, 154-160.
- GAHETE, M. D., DURAN-PRADO, M., LUQUE, R. L. M., MARTINEZ-FUENTES, A. J., VAZQUEZ-MARTINEZ, R., MALAGON, M. M. & CASTAÑO, J. P. (2008). Are somatostatin and cortistatin two siblings in regulating endocrine secretions? In vitro work ahead. *Molecular and Cellular Endocrinology* *Special Issue: Somatostatin, Cortistatin and their Receptors in Health and Disease* **286**, 128-134.
- GAUNA, C., DELHANTY, P. J. D., HOFLAND, L. J., JANSSEN, J. A. M. J. L., BROGLIO, F., ROSS, R. J. M., GHIGO, E. & VAN DER LELY, A. J. (2005). Ghrelin Stimulates, Whereas Des-Octanoyl Ghrelin Inhibits, Glucose Output by Primary Hepatocytes. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **90**, 1055-1060.

- GIANNOUKAKIS, N., RUDERT, W. A., TRUCCO, M. & ROBBINS, P. D. (2000). Protection of Human Islets from the Effects of Interleukin-1 β by Adenoviral Gene Transfer of an I κ B Repressor. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 36509-36513.
- GNANAPAVAN, S., KOLA, B., BUSTIN, S. A., MORRIS, D. G., MCGEE, P., FAIRCLOUGH, P., BHATTACHARYA, S., CARPENTER, R., GROSSMAN, A. B. & KORBONITS, M. R. (2002). The Tissue Distribution of the mRNA of Ghrelin and Subtypes of Its Receptor, GHS-R, in Humans. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **87**, 2988.
- GÓMEZ, R., LAGO, F., GÓMEZ-REINO, J. J. & GUALILLO, O. (2009). Novel factors as therapeutic targets to treat diabetes. Focus on leptin and ghrelin. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* **13**, 583-591.
- GONZALEZ-REY, E., CHORNY, A., ROBLEDI, G. & DELGADO, M. (2006). Cortistatin, a new antiinflammatory peptide with therapeutic effect on lethal endotoxemia. [10.1084/jem.20052017](https://doi.org/10.1084/jem.20052017) *The Journal of Experimental Medicine* **203** 563-571
- GONZALEZ-REY E, D.-M. V., SOUZA MOREIRA L, DELGADO M. (2010). Neuropeptides as therapeutic approach to autoimmune diseases. *Curr Pharm Des.* **16**, 3158-3172.
- GRANATA, R., BARAGLI, A., SETTANNI, F., SCARLATTI, F. & GHIGO, E. (2010a). Unraveling the role of the ghrelin gene peptides in the endocrine pancreas. *Journal of Molecular Endocrinology* **45**, 107-118.
- GRANATA, R., GALLO, D., LUQUE, R. M., BARAGLI, A., SCARLATTI, F., GRANDE, C., GESMUNDO, I., CÓRDOBA-CHACÓN, J., BERGANDI, L., SETTANNI, F., TOGLIATTO, G., VOLANTE, M., GARETTO, S., ANNUNZIATA, M., CHANCLÓN, B., GARGANTINI, E., ROCCHIETTO, S., MATERA, L., DATTA, G., MORINO, M., BRIZZI, M. F., ONG, H., CAMUSSI, G., CASTAÑO, J. P., PAPOTTI, M. & GHIGO, E. (2012a). Obestatin regulates adipocyte function and protects against diet-induced insulin resistance and inflammation. *The FASEB Journal* **26**, 3393-3411.
- GRANATA, R., ISGAARD, J., ALLOATTI, G. & GHIGO, E. (2011). Cardiovascular actions of the ghrelin gene-derived peptides and growth hormone-releasing hormone. *Experimental Biology and Medicine* **236**, 505-514.
- GRANATA, R., SETTANNI, F., BIANCONE, L., TROVATO, L., NANO, R., BERTUZZI, F., DESTEFANIS, S., ANNUNZIATA, M., MARTINETTI, M., CATAPANO, F., GHÈ, C., ISGAARD, J., PAPOTTI, M., GHIGO, E. & MUCCIOLI, G. (2007). Acylated and Unacylated Ghrelin Promote Proliferation and Inhibit Apoptosis of Pancreatic β -Cells and Human Islets: Involvement of 3',5'-Cyclic Adenosine Monophosphate/Protein Kinase A, Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2, and Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Signaling. *Endocrinology* **148**, 512-529.
- GRANATA, R., SETTANNI, F., JULIEN, M., NANO, R., TOGLIATTO, G., TROMBETTA, A., GALLO, D., PIEMONTE, L., BRIZZI, M. F., ABRIBAT, T., VAN DER LELY, A.-J. & GHIGO, E. (2012b). Des-Acyl Ghrelin Fragments and Analogues Promote Survival of Pancreatic β -Cells and Human Pancreatic Islets and Prevent Diabetes in Streptozotocin-Treated Rats. *Journal of Medicinal Chemistry* **55**, 2585-2596.
- GRANATA, R., VOLANTE, M., SETTANNI, F., GAUNA, C., GHÈ, C., ANNUNZIATA, M., DEIDDA, B., GESMUNDO, I., ABRIBAT, T., VAN DER LELY, A.-J., MUCCIOLI, G., GHIGO, E. & PAPOTTI, M. (2010b). Unacylated ghrelin and obestatin increase islet cell mass and prevent

- diabetes in streptozotocin-treated newborn rats. *Journal of Molecular Endocrinology* **45**, 9-17.
- GRANATA , S. F., TROVATO L, DESTEFANIS S, GALLO D, MARTINETTI M, GHIGO E, MUCCIOLI G. (2006). Unacylated as well as acylated ghrelin promotes cell survival and inhibit apoptosis in HIT-T15 pancreatic beta-cells. *J Endocrinol Invest.* **29**, RC19-22.
- GREGOR, M. F. & HOTAMISLIGIL, G. K. S. (2011). Inflammatory Mechanisms in Obesity. *Annual Review of Immunology* **29**, 415-445.
- GROTTOLI, S., GASCO, V., BROGLIO, F., BALDELLI, R., RAGAZZONI, F., GALLENCIA, F., MAINOLFI, A., PRODAM, F., MUCCIOLI, G. & GHIGO, E. (2006). Cortistatin-17 and Somatostatin-14 Display the Same Effects on Growth Hormone, Prolactin, and Insulin Secretion in Patients with Acromegaly or Prolactinoma. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **91**, 1595-1599.
- GUALILLO, O., LAGO, F. & DIEGUEZ, C. (2008). Introducing GOAT: a target for obesity and anti-diabetic drugs? *Trends in pharmacological sciences* **29**, 398-401.
- GUAN, X.-M., YU, H., PALYHA, O. C., MCKEE, K. K., FEIGNER, S. D., SIRINATHSINGHI, D. J. S., SMITH, R. G., VAN DER PLOEG, L. H. T. & HOWARD, A. D. (1997). Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. *Molecular Brain Research* **48**, 23-29.
- GUTIERREZ, J. A., SOLENBERG, P. J., PERKINS, D. R., WILLENCY, J. A., KNIERMAN, M. D., JIN, Z., WITCHER, D. R., LUO, S., ONYIA, J. E. & HALE, J. E. (2008). Ghrelin octanoylation mediated by an orphan lipid transferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 6320-6325.
- HANSEN, P.O., G. A., T.B., B. & P., W. (2004). Inhibition of Insulin Secretion as a New Drug Target in the Treatment of Metabolic Disorders. *Current Medicinal Chemistry* **11**, 1595-1615.
- HAUGE-EVANS, A. C., KING, A. J., CARMIGNAC, D., RICHARDSON, C. C., ROBINSON, I. C. A. F., LOW, M. J., CHRISTIE, M. R., PERSAUD, S. J. & JONES, P. M. (2009). Somatostatin Secreted by Islet δ -Cells Fulfills Multiple Roles as a Paracrine Regulator of Islet Function. *Diabetes* **58**, 403-411.
- HILL, J. O. (2006). Understanding and Addressing the Epidemic of Obesity: An Energy Balance Perspective. *Endocrine Reviews* **27**, 750-761.
- HOSODA, H., DOI, K., NAGAYA, N., OKUMURA, H., NAKAGAWA, E., ENOMOTO, M., ONO, F. & KANGAWA, K. (2004). Optimum Collection and Storage Conditions for Ghrelin Measurements: Octanoyl Modification of Ghrelin Is Rapidly Hydrolyzed to Desacyl Ghrelin in Blood Samples. *Clinical Chemistry* **50**, 1077-1080.
- HOSODA, H., KOJIMA, M., MATSUO, H. & KANGAWA, K. (2000). Ghrelin and Des-acyl Ghrelin: Two Major Forms of Rat Ghrelin Peptide in Gastrointestinal Tissue. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **279**, 909-913.
- HOWARD, A. D., FEIGNER, S. D., CULLY, D. F., ARENA, J. P., LIBERATOR, P. A., ROSENBLUM, C. I., HAMELIN, M., HRENIUK, D. L., PALYHA, O. C., ANDERSON, J., PARESS, P. S., DIAZ, C., CHOU, M.,

- LIU, K. K., MCKEE, K. K., PONG, S. S., CHAUNG, L. Y., ELBRECHT, A., DASHKEVICZ, M., HEAVENS, R., RIGBY, M., SIRINATHSINGHI, D. J., DEAN, D. C., MELILLO, D. G., PATCHETT, A. A., NARGUND, R., GRIFFIN, P. R., DEMARTINO, J. A., GUPTA, S. K., SCHAEFFER, J. M., SMITH, R. G. & VAN DER PLOEG, L. H. (1996). A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science* **273**, 974-977.
- HOWARD AD, F. S., CULLY DF, ARENA JP, LIBERATOR PA, ROSENBLUM CI, HAMELIN M, HRENIUK DL, PALYHA OC, ANDERSON J, PARESS PS, DIAZ C, CHOU M, LIU KK, MCKEE KK, PONG SS, CHAUNG LY, ELBRECHT A, DASHKEVICZ M, HEAVENS R, RIGBY M, SIRINATHSINGHI DJ, DEAN DC, MELILLO DG, PATCHETT AA, NARGUND R, GRIFFIN PR, DEMARTINO JA, GUPTA SK, SCHAEFFER JM, SMITH RG, VAN DER PLOEG LH. (1996). A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science* **273**, 974-977.
- INHOFF, T., MÄNNIKES, H., NOETZEL, S., STENGEL, A., GOEBEL, M., DINH, Q. T., RIEDL, A., BANNERT, N., WISSER, A.-S., WIEDENMANN, B., KLAPP, B. F., TACHŮ, Y. & KOBELT, P. (2008). Desacyl ghrelin inhibits the orexigenic effect of peripherally injected ghrelin in rats. *Peptides* **29**, 2159-2168.
- INHOFF, T., WIEDENMANN, B., KLAPP, B. F., MÄNNIKES, H. & KOBELT, P. (2009). Is desacyl ghrelin a modulator of food intake? *Peptides* **30**, 991-994.
- IONOV, I. D. (2008). Self-Amplification of Nigral Degeneration in Parkinson's Disease: A Hypothesis. *International Journal of Neuroscience* **118**, 1741-1758.
- IRAKO, T., AKAMIZU, T., HOSODA, H., IWAKURA, H., ARIYASU, H., TOJO, K., TAJIMA, N. & KANGAWA, K. (2006). Ghrelin prevents development of diabetes at adult age in streptozotocin-treated newborn rats. *Diabetologia* **49**, 1264-1273.
- IWANAGA, T., MIKI, T. & TAKAHASHI-IWANAGA, H. (2011). Restricted expression of somatostatin receptor 3 to primary cilia in the pancreatic islets and adenohypophysis of mice. *Biomedical Research* **32**, 73-81.
- JUONALA, M., MAGNUSSEN, C. G., BERENSON, G. S., VENN, A., BURNS, T. L., SABIN, M. A., SRINIVASAN, S. R., DANIELS, S. R., DAVIS, P. H., CHEN, W., SUN, C., CHEUNG, M., VIKARI, J. S. A., DWYER, T. & RAITAKARI, O. T. (2011). Childhood Adiposity, Adult Adiposity, and Cardiovascular Risk Factors. *New England Journal of Medicine* **365**, 1876-1885.
- KAGEYAMA, H., FUNAHASHI, H., HIRAYAMA, M., TAKENOYA, F., KITA, T., KATO, S., SAKURAI, J., LEE, E. Y., INOUE, S., DATE, Y., NAKAZATO, M., KANGAWA, K. & SHIODA, S. (2005). Morphological analysis of ghrelin and its receptor distribution in the rat pancreas. *Regulatory Peptides Satellite Symposium on G-Protein-Coupled Receptors (GPCRs) (held during the 6th International Symposium on VIP, PACAP and Related Peptides)* **126**, 67-71.
- KAHN, S. E., HULL, R. L. & UTZSCHNEIDER, K. M. (2006). Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* **444**, 840-846.
- KAILEY, B., VAN DE BUNT, M., CHELEY, S., JOHNSON, P. R., MACDONALD, P. E., GLOYN, A. L., RORSMAN, P. & BRAUN, M. (2012). SSTR2 is the functionally dominant somatostatin receptor in human pancreatic β - and α -cells. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism*.

- KEREM, M., SALMAN, B., OZSOY, S., PASAOGLU, H., BEDIRLI, A., HAZIROGLU, R. & YILMAZ, T. (2009). Exogenous Ghrelin Enhances Endocrine and Exocrine Regeneration in Pancreatectomized Rats. *Journal of Gastrointestinal Surgery* **13**, 775-783.
- KIM, M. S., YOON, C. Y., JANG, P. G., PARK, Y. J., SHIN, C. S., PARK, H. S., RYU, J. W., PAK, Y. K., PARK, J. Y., LEE, K. U., KIM, S. Y., LEE, H. K., KIM, Y. B. & PARK, K. S. (2004). The Mitogenic and Antiapoptotic Actions of Ghrelin in 3T3-L1 Adipocytes. *Molecular Endocrinology* **18**, 2291-2301.
- KINEMAN, R. D., GAHETE, M. D. & LUQUE, R. M. (2007). Identification of a mouse ghrelin gene transcript that contains intron 2 and is regulated in the pituitary and hypothalamus in response to metabolic stress. *Journal of Molecular Endocrinology* **38**, 511-521.
- KLAFF LJ, T. G. J. (1987). Pancreatic somatostatin is a mediator of glucagon inhibition by hyperglycemia. *Diabetes* **36**, 592-596.
- KOJIMA, M., HOSODA, H., DATE, Y., NAKAZATO, M., MATSUO, H. & KANGAWA, K. (1999). Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. **402**, 656-660.
- KOJIMA, M. & KANGAWA, K. (2005a). Ghrelin: structure and function. *Physiol Rev* **85**, 495-522.
- KOJIMA, M. & KANGAWA, K. (2005b). Ghrelin: Structure and Function. *Physiological Reviews* **85**, 495-522.
- KOJIMA, M. & KANGAWA, K. (2010). Ghrelin: more than endogenous growth hormone secretagogue. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1200**, 140-148.
- KOPELMAN, P. G. (2000). Obesity as a medical problem. **404**, 635-643.
- KRANTIC, S., GODDARD, I., SAVEANU, A., GIANNETTI, N., FOMBONNE, J., CARDOSO, A., JAQUET, P. & ENJALBERT, A. (2004). Novel modalities of somatostatin actions. *European Journal of Endocrinology* **151**, 643-655.
- KUMAR, U., SASI, R., SURESH, S., PATEL, A., THANGARAJU, M., METRAKOS, P., PATEL, S. C. & PATEL, Y. C. (1999). Subtype-selective expression of the five somatostatin receptors (hSSTR1-5) in human pancreatic islet cells: a quantitative double-label immunohistochemical analysis. [10.2337/diabetes.48.1.77](#) *Diabetes* **48** 77-85
- LAMMERT, R. J. A. E. (2009). Cell-cell interactions in the endocrine pancreas. *Diabetes, Obesity and Metabolism* **11**, 159-167.
- LAWRENCE, C. B., SNAPE, A. C., BAUDOIN, F. M.-H. & LUCKMAN, S. M. (2002). Acute Central Ghrelin and GH Secretagogues Induce Feeding and Activate Brain Appetite Centers. *Endocrinology* **143**, 155-162.
- LEE, H.-M., WANG, G., ENGLANDER, E. W., KOJIMA, M. & GREELEY JR., G. H. (2002). Ghrelin, A New Gastrointestinal Endocrine Peptide that Stimulates Insulin Secretion: Enteric Distribution, Ontogeny, Influence of Endocrine, and Dietary Manipulations. *Endocrinology* **143**, 185-190.

- LIM, C., KOLA, B. & KORBONITS, M. (2011). The ghrelin/GOAT/GHS-R system and energy metabolism. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders* **12**, 173-186.
- LIU, J., PRUDOM, C. E., NASS, R., PEZZOLI, S. S., OLIVERI, M. C., JOHNSON, M. L., VELDHUIS, P., GORDON, D. A., HOWARD, A. D., WITCHER, D. R., GEYSEN, H. M., GAYLINN, B. D. & THORNER, M. O. (2008). Novel Ghrelin Assays Provide Evidence for Independent Regulation of Ghrelin Acylation and Secretion in Healthy Young Men. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **93**, 1980-1987.
- LUDVIGSEN, E., OLSSON, R., STRIDSBERG, M., JANSON, E. T. & SANDLER, S. (2004). Expression and Distribution of Somatostatin Receptor Subtypes in the Pancreatic Islets of Mice and Rats. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **52**, 391-400.
- LUDVIGSEN, E., STRIDSBERG, M., JANSON, E. & SANDLER, S. (2011). Altered Expression of Somatostatin Receptors in Pancreatic Islets from NOD Mice Cultured at Different Glucose Concentrations In Vitro and in Islets Transplanted to Diabetic NOD Mice In Vivo. *Experimental Diabetes Research* **2011**.
- LUDVIGSEN, E., STRIDSBERG, M., JANSON, E. T. & SANDLER, S. (2005). Expression of somatostatin receptor subtypes 1-5 in pancreatic islets of normoglycaemic and diabetic NOD mice. *European Journal of Endocrinology* **153**, 445-454.
- LUQUE, R. M., DURÁN-PRADO, M., GARCÍA-NAVARRO, S., GRACIA-NAVARRO, F., KINEMAN, R. D., MALAGÓN, M. M. & CASTAÑO, J. P. (2006a). Identification of the Somatostatin Receptor Subtypes (sst) Mediating the Divergent, Stimulatory/Inhibitory Actions of Somatostatin on Growth Hormone Secretion. *Endocrinology* **147**, 2902-2908.
- LUQUE, R. M., GAHETE, M. D., HOCHGESCHWENDER, U. & KINEMAN, R. D. (2006b). Evidence that endogenous SST inhibits ACTH and ghrelin expression by independent pathways. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism* **291**, E395-E403.
- LUQUE, R. M. & KINEMAN, R. D. (2007). Gender-Dependent Role of Endogenous Somatostatin in Regulating Growth Hormone-Axis Function in Mice. *Endocrinology* **148**, 5998-6006.
- LUQUE, R. M., LIN, Q., CÓRDOBA-CHACÓN, J., SUBBAIAH, P. V., BUCH, T., WAISMAN, A., VANKELECOM, H. & KINEMAN, R. D. (2011). Metabolic Impact of Adult-Onset, Isolated, Growth Hormone Deficiency (AOiGHD) Due to Destruction of Pituitary Somatotropes. *PLoS ONE* **6**, e15767.
- LUQUE, R. M., PARK, S. & KINEMAN, R. D. (2007). Severity of the Catabolic Condition Differentially Modulates Hypothalamic Expression of Growth Hormone-Releasing Hormone in the Fasted Mouse: Potential Role of Neuropeptide Y and Corticotropin-Releasing Hormone. *Endocrinology* **148**, 300-309.
- LUQUE, R. M., PARK, S. & KINEMAN, R. D. (2008). Role of endogenous somatostatin in regulating GH output under basal conditions and in response to metabolic extremes. *Molecular and Cellular Endocrinology* **286**, 155-168.
- LUSTIG, R. H., HINDS, P. S., RINGWALD-SMITH, K., CHRISTENSEN, R. K., KASTE, S. C., SCHREIBER, R. E., RAI, S. N., LENSING, S. Y., WU, S. & XIONG, X. (2003). Octreotide Therapy of Pediatric

- Hypothalamic Obesity: A Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **88**, 2586-2592.
- MAKINO, H., MATSUSHIMA, Y., KANATSUKA, A., YAMAMOTO, M., KUMAGAI, A. & NISHIMURA, M. (1979). Changes in Pancreatic Somatostatin Content in Spontaneously Diabetic Mice, as Determined by Radioimmunoassay and Immunohistochemical Methods. *Endocrinology* **104**, 243-247.
- MANDARINO, L., STENNER, D., BLANCHARD, W., NISSEN, S., GERICH, J., LING, N., BRAZEAU, P., BOHLEN, P., ESCH, F. & GUILLEMIN, R. (1981). Selective effects of somatostatin-14, -25 and -28 on in vitro insulin and glucagon secretion. *Nature* **291**, 76-77.
- MASUDA, Y., TANAKA, T., INOMATA, N., OHNUMA, N., TANAKA, S., ITOH, Z., HOSODA, H., KOJIMA, M. & KANGAWA, K. (2000). Ghrelin stimulates gastric acid secretion and motility in rats. *Biochem Biophys Res Commun* **276**, 905-908.
- MOLLER, L. N., STIDSEN, C. E., HARTMANN, B. & HOLST, J. J. (2003). Somatostatin receptors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1616**, 1-84.
- MUCCIOLI, G., BARAGLI, A., GRANATA, R., PAPOTTI, M. & GHIGO, E. (2007). Heterogeneity of Ghrelin/Growth Hormone Secretagogue Receptors. *Neuroendocrinology* **86**, 147-164.
- MUCCIOLI, G., TSCHÄP, M., PAPOTTI, M., DEGHENGI, R., HEIMAN, M. & GHIGO, E. (2002). Neuroendocrine and peripheral activities of ghrelin: implications in metabolism and obesity. *European Journal of Pharmacology* *The pharmacotherapy of obesity* **440**, 235-254.
- MURRAY, F., BELL, D., KELSO, E. J., MILLAR, B. C. & MCDERMOTT, B. J. (2001). Positive and Negative Contractile Effects of Somatostatin-14 on Rat Ventricular Cardiomyocytes. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* **37**, 324-332.
- NOE, B. D. (1981). Synthesis of one form of pancreatic islet somatostatin predominates. . *Journal of Biological Chemistry* **256** 9397-9400
- NOGUEIRAS, R., WILLIAMS, L. M. & DIEGUEZ, C. (2010). Ghrelin: New Molecular Pathways Modulating Appetite and Adiposity. *Obesity Facts* **3**, 285-292.
- OLIAS, G., VIOLLET, C., KUSSEROW, H., EPELBAUM, J. & MEYERHOF, W. (2004). Regulation and function of somatostatin receptors. *Journal of Neurochemistry* **89**, 1057-1091.
- PAPOTTI, M., TARABRA, E., ALLIA, E., BOZZALLA-CASSIONE, F., BROGLIO, F., DEGHENGI, R., GHIGO, E. & MUCCIOLI, G. (2003). Presence of cortistatin in the human pancreas. *J Endocrinol Invest.* **26**, RC15-18.
- PAPOTTI M, T. E., ALLIA E, BOZZALLA-CASSIONE F, BROGLIO F, DEGHENGI R, GHIGO E, MUCCIOLI G. (2003). Presence of cortistatin in the human pancreas. *J Endocrinol Invest.* **26**, RC15-18.
- PATEL. (1999). Somatostatin and its receptor family. *Front Neuroendocrinol.* **20**, 157-198.

- PORTELA-GOMES, G. M., GRIMELIUS, L., WESTERMARK, P. & STRIDSBERG, M. (2010). Somatostatin Receptor Subtypes in Human Type 2 Diabetic Islets. *Pancreas* **39**, 836-842
810.1097/MPA.1090b1013e3181cf1878.
- PRADAYROL L, JÖRNVALL H, MUTT V & A., R. (1980). N-terminally extended somatostatin: the primary structure of somatostatin-28. *FEBS Lett.* **109**, 55-58.
- PRADO, C. L., PUGH-BERNARD, A. E., ELGHAZI, L., SOSA-PINEDA, B. & SUSSEL, L. (2004). Ghrelin cells replace insulin-producing beta cells in two mouse models of pancreas development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 2924-2929.
- QADER, S. S., HÅKANSON, R., REHFELD, J. F., LUNDQUIST, I. & SALEHI, A. (2008). Proghrelin-derived peptides influence the secretion of insulin, glucagon, pancreatic polypeptide and somatostatin: A study on isolated islets from mouse and rat pancreas. *Regulatory Peptides* **146**, 230-237.
- QADER, S. S., LUNDQUIST, I., EKELUND, M., HÅKANSON, R. & SALEHI, A. (2005). Ghrelin activates neuronal constitutive nitric oxide synthase in pancreatic islet cells while inhibiting insulin release and stimulating glucagon release. *Regulatory Peptides* **128**, 51-56.
- RAULF F, PÉREZ J, HOYER D & C., B. (1994). Differential expression of five somatostatin receptor subtypes, SSTR1-5, in the CNS and peripheral tissue. *Digestion.* **55**, 46-53.
- REICHLIN, S. (1983). Somatostatin. *New England Journal of Medicine* **309**, 1556-1563.
- ROBAS, N., MEAD, E. & FIDOCK, M. (2003). MrgX2 Is a High Potency Cortistatin Receptor Expressed in Dorsal Root Ganglion. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 44400-44404.
- SAAD, M. F., BERNABA, B., HWU, C.-M., JINAGOUDA, S., FAHMI, S., KOGOSOV, E. & BOYADJIAN, R. (2002). Insulin Regulates Plasma Ghrelin Concentration. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **87**, 3997-4000.
- SAHIN, İ., AYDIN, S., OZKAN, Y., DAGLI, A., AKIN, K., GUZEL, S., CATAK, Z. & OZERCAN, M. (2011). Diet-induced obesity suppresses ghrelin in rat gastrointestinal tract and serum. *Molecular and Cellular Biochemistry* **355**, 299-308.
- SALEHI, A., DORNONVILLE DE LA COUR, C., HÅKANSON, R. & LUNDQUIST, I. (2004). Effects of ghrelin on insulin and glucagon secretion: a study of isolated pancreatic islets and intact mice. *Regulatory Peptides* **118**, 143-150.
- SAMUEL, V. T., PETERSEN, K. F. & SHULMAN, G. I. (2010). Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism. *The Lancet* **375**, 2267-2277.
- SCELLEKENS, H., DINAN, T. G. & CRYAN, J. F. (2010). Lean mean fat reducing “ghrelin” machine: Hypothalamic ghrelin and ghrelin receptors as therapeutic targets in obesity. *Neuropharmacology* **58**, 2-16.
- SEIM, I., AMORIM, L., WALPOLE, C., CARTER, S., CHOPIN, L. K. & HERINGTON, A. C. (2010). Ghrelin gene-related peptides: Multifunctional endocrine/autocrine modulators in health and disease. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* **37**, 125-131.

- SEIM, I., JOSH, P., CUNNINGHAM, P., HERINGTON, A. & CHOPIN, L. (2011). Ghrelin axis genes, peptides and receptors: Recent findings and future challenges. *Molecular and Cellular Endocrinology* **340**, 3-9.
- SHIMBARA, T., MONDAL, M. S., KAWAGOE, T., TOSHINAI, K., KODA, S., YAMAGUCHI, H., DATE, Y. & NAKAZATO, M. (2004). Central administration of ghrelin preferentially enhances fat ingestion. *Neuroscience Letters* **369**, 75-79.
- SINGH, V., GRÖTZINGER, C., NOWAK, K. W., ZACHARIAS, S., GÖNCZ, E., PLESS, G., SAUER, I. M., EICHHORN, I., PFEIFFER-GUGLIELMI, B., HAMPRECHT, B., WIEDENMANN, B., PLÖCKINGER, U. & STROWSKI, M. Z. (2007). Somatostatin Receptor Subtype-2-Deficient Mice with Diet-Induced Obesity Have Hyperglycemia, Nonfasting Hyperglucagonemia, and Decreased Hepatic Glycogen Deposition. *Endocrinology* **148**, 3887-3899.
- SOLOMON, T. P. J., CHAMBERS, E. S., JEUKENDRUP, A. E., TOOGOOD, A. A. & BLANNIN, A. K. (2008). The effect of feeding frequency on insulin and ghrelin responses in human subjects. *British Journal of Nutrition* **100**, 810-819.
- SOTOS-PRieto, M., GUILLÉN, M., GUILLEM-SÁIZ, P., PORTOLÉS, O. & CORELLA, D. (2010). The rs1466113 Polymorphism in the Somatostatin Receptor 2 Gene Is Associated with Obesity and Food Intake in a Mediterranean Population. *Annals of Nutrition and Metabolism* **57**, 124-131.
- SOUZA-MOREIRA, L., CAMPOS-SALINAS, J., CARO, M. & GONZALEZ-REY, E. (2011). Neuropeptides as Pleiotropic Modulators of the Immune Response. *Neuroendocrinology* **94**, 89-100.
- SPIER, A. D. & DE LECEA, L. (2000). Cortistatin: a member of the somatostatin neuropeptide family with distinct physiological functions. *Brain Research Reviews* **33**, 228-241.
- STENGEL, A., COSKUN, T., GOEBEL, M., WANG, L., CRAFT, L., ALSINA-FERNANDEZ, J., RIVIER, J. & TACHÉ, Y. (2010). Central Injection of the Stable Somatostatin Analog ODT8-SST Induces a Somatostatin2 Receptor-Mediated Orexigenic Effect: Role of Neuropeptide Y and Opioid Signaling Pathways in Rats. *Endocrinology* **151**, 4224-4235.
- STENGEL, A., GOEBEL-STENGEL, M., WANG, L., LUCKEY, A., HU, E., RIVIER, J. & TACHÉ, Y. (2011). Central administration of pan-somatostatin agonist ODT8-SST prevents abdominal surgery-induced inhibition of circulating ghrelin, food intake and gastric emptying in rats. *Neurogastroenterology & Motility* **23**, e294-e308.
- STEPANYAN, Z., KOCHARYAN, A., BEHRENS, M., KOEBNICK, C., PYRSKI, M. & MEYERHOF, W. (2007). Somatostatin, a negative-regulator of central leptin action in the rat hypothalamus. *Journal of Neurochemistry* **100**, 468-478.
- STROWSKI, M. Z. & BLAKE, A. D. (2008). Function and expression of somatostatin receptors of the endocrine pancreas. *Molecular and Cellular Endocrinology Special Issue: Somatostatin, Cortistatin and their Receptors in Health and Disease* **286**, 169-179.
- STROWSKI, M. Z., KOHLER, M., CHEN, H. Y., TRUMBAUER, M. E., LI, Z., SZALKOWSKI, D., GOPAL-TRUTER, S., FISHER, J. K., SCHAEFFER, J. M., BLAKE, A. D., ZHANG, B. B. & WILKINSON, H. A. (2003).

- Somatostatin Receptor Subtype 5 Regulates Insulin Secretion and Glucose Homeostasis. *Molecular Endocrinology* **17**, 93-106.
- STROWSKI, M. Z., PARMAR, R. M., BLAKE, A. D. & SCHAEFFER, J. M. (2000). Somatostatin Inhibits Insulin and Glucagon Secretion via Two Receptor Subtypes: An in Vitro Study of Pancreatic Islets from Somatostatin Receptor 2 Knockout Mice
10.1210/en.141.1.111 *Endocrinology* **141** 111-117
- SUN, Y., ASNICAR, M., SAHA, P. K., CHAN, L. & SMITH, R. G. (2006). Ablation of ghrelin improves the diabetic but not obese phenotype of ob/ob mice. *Cell Metabolism* **3**, 379-386.
- SUN, Y., WANG, P., ZHENG, H. & SMITH, R. G. (2004). Ghrelin stimulation of growth hormone release and appetite is mediated through the growth hormone secretagogue receptor
10.1073/pnas.0305930101 *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101** 4679-4684
- SUTTON, B. S., PALMER, N. D., LANGEFELD, C. D., XUE, B., PROCTOR, A., ZIEGLER, J. T., HAFFNER, S. M., NORRIS, J. M. & BOWDEN, D. W. (2009). Association of SSTR2 Polymorphisms and Glucose Homeostasis Phenotypes: The Insulin Resistance Atherosclerosis Family Study. *Diabetes* **58**, 1457-1462.
- TABORSKY, G. J. (1983). Evidence of a paracrine role for pancreatic somatostatin in vivo
American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism **245** E598-E603
- TABORSKY, G. J. & ENSINCK, J. W. (1984). Contribution of the pancreas to circulating somatostatin-like immunoreactivity in the normal dog. *The Journal of Clinical Investigation* **73**, 216-223.
- TACHIBANA, T., CLINE, M. A., SUGAHARA, K., UEDA, H. & HIRAMATSU, K. (2009). Central administration of somatostatin stimulates feeding behavior in chicks. *General and Comparative Endocrinology* **161**, 354-359.
- TENA-SEMPERE, M. (2005). Ghrelin: novel regulator of gonadal function. *J Endocrinol Invest* **28**, 26-29.
- TENA-SEMPERE, M., BARREIRO, M. L., GONZÁLEZ, L. C., GAYTÁN, F., ZHANG, F.-P., CAMINOS, J. E., PINILLA, L., CASANUEVA, F. F., DIÉGUEZ, C. & AGUILAR, E. (2002). Novel Expression and Functional Role of Ghrelin in Rat Testis. *Endocrinology* **143**, 717-725.
- TIAN, Q. P., FENG, X. R., PANG, Y. Z., TANG, C. S. & LIU, M. L. (2009). *[Relationship between plasma cortistatin and coronary heart disease]*, vol. 41.
- TOSTIVINT, H., JOLY, L., LIHRMANN, I., PARMENTIER, C., LEBON, A., MORISSON, M., CALAS, A., EKKER, M. & VAUDRY, H. (2006). Comparative genomics provides evidence for close evolutionary relationships between the urotensin II and somatostatin gene families
10.1073/pnas.0510700103 *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103** 2237-2242
- TSCHÖP, M., SMILEY, D. L. & HEIMAN, M. L. (2000). Ghrelin induces adiposity in rodents. **407**, 908-913.

- TSCHÖP, M., WEYER, C., TATARANNI, P. A., DEVANARAYAN, V., RAVUSSIN, E. & HEIMAN, M. L. (2001). Circulating Ghrelin Levels Are Decreased in Human Obesity. *Diabetes* **50**, 707-709.
- TZOTZAS, T., PAPAISIS, K., PERROS, P. & KRASSAS, G. (2008). Use of Somatostatin Analogues in Obesity. *Drugs* **68**, 1963-1973.
- TZOTZAS T, P. K., PERROS P, KRASSAS GE. (2008). Use of Somatostatin Analogues in Obesity. *Drugs* **68**, 1963-1973.
- VAN DER LELY, A. J., TSCHOP, M., HEIMAN, M. L. & GHIGO, E. (2004). Biological, physiological, pathophysiological, and pharmacological aspects of ghrelin. *Endocr Rev* **25**, 426-457.
- VANETTI, M., KOUBA, M., WANG, X., VOGT, G. & HÖLLT, V. (1992). Cloning and expression of a novel mouse somatostatin receptor (SSTR2B). *FEBS Letters* **311**, 290-294.
- VOLANTE, M., FULCHERI, E., ALLIÈRE, E., CERRATO, M., PUCCI, A. & PAPOTTI, M. (2002). Ghrelin Expression in Fetal, Infant, and Adult Human Lung. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **50**, 1013-1021.
- WEINER, M. W., VEITCH, D. P., AISEN, P. S., BECKETT, L. A., CAIRNS, N. J., GREEN, R. C., HARVEY, D., JACK, C. R., JAGUST, W., LIU, E., MORRIS, J. C., PETERSEN, R. C., SAYKIN, A. J., SCHMIDT, M. E., SHAW, L., SIUCIAK, J. A., SOARES, H., TOGA, A. W. & TROJANOWSKI, J. Q. (2012). The Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative: A review of papers published since its inception. *Alzheimer's & Dementia* **8**, S1-S68.
- WIERUP, N., SVENSSON, H., MULDER, H. & SUNDLER, F. (2002). The ghrelin cell: a novel developmentally regulated islet cell in the human pancreas. *Regulatory Peptides* **107**, 63-69.
- WIERUP, N., YANG, S., MCEVILLY, R. J., MULDER, H. & SUNDLER, F. (2004). Ghrelin Is Expressed in a Novel Endocrine Cell Type in Developing Rat Islets and Inhibits Insulin Secretion from INS-1 (832/13) Cells
10.1177/002215540405200301 *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **52** 301-310
- WINZELL, M. S. & AHRÉN, B. (2007). G-protein-coupled receptors and islet function—Implications for treatment of type 2 diabetes. *Pharmacology & Therapeutics* **116**, 437-448.
- WORTLEY, K. E., DEL RINCON, J.-P., MURRAY, J. D., GARCIA, K., IIDA, K., THORNER, M. O. & SLEEMAN, M. W. (2005). Absence of ghrelin protects against early-onset obesity. *The Journal of Clinical Investigation* **115**, 3573-3578.
- WREN, A. M., SEAL, L. J., COHEN, M. A., BRYNES, A. E., FROST, G. S., MURPHY, K. G., DHILLO, W. S., GHATEI, M. A. & BLOOM, S. R. (2001). Ghrelin Enhances Appetite and Increases Food Intake in Humans. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **86**, 5992.
- YANG, J., BROWN, M. S., LIANG, G., GRISHIN, N. V. & GOLDSTEIN, J. L. (2008). Identification of the Acyltransferase that Octanoylates Ghrelin, an Appetite-Stimulating Peptide Hormone. *Cell* **132**, 387-396.

- ZHANG, J. V., REN, P.-G., AVSIAN-KRETCHMER, O., LUO, C.-W., RAUCH, R., KLEIN, C. & HSUEH, A. J. W. (2005). Obestatin, a Peptide Encoded by the Ghrelin Gene, Opposes Ghrelin's Effects on Food Intake. *Science* **310**, 996-999.
- ZHU, X., CAO, Y., VOODG, K. & STEINER, D. F. (2006). On the Processing of Proghrelin to Ghrelin. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 38867-38870.
- ZIGMAN, J. M., NAKANO, Y., COPPARI, R., BALTHASAR, N., MARCUS, J. N., LEE, C. E., JONES, J. E., DEYSHER, A. E., WAXMAN, A. R., WHITE, R. D., WILLIAMS, T. D., LACHEY, J. L., SEELEY, R. J., LOWELL, B. B. & ELMQUIST, J. K. (2005). Mice lacking ghrelin receptors resist the development of diet-induced obesity. *The Journal of Clinical Investigation* **115**, 3564-3572.
- ZORRILLA, E. P., IWASAKI, S., MOSS, J. A., CHANG, J., OTSUJI, J., INOUE, K., MEIJLER, M. M. & JANDA, K. D. (2006). Vaccination against weight gain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 13226-13231.

Anexos



Role of SST, CORT, and ghrelin and its receptors at the endocrine pancreas

Belén Chanclón^{1,2,3†}, Antonio J. Martínez-Fuentes^{1,2,3†} and Francisco Gracia-Navarro^{1,2,3*}

¹ Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, University of Córdoba, Córdoba, Spain

² Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba, Córdoba, Spain

³ Centro de Investigación Biomédica en Red Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición, Córdoba, Spain

Edited by:

Corinne Bousquet, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, France

Reviewed by:

Mathias Strowski, Charité University of Berlin, Germany

Riccarda Granata, University of Turin, Italy

*Correspondence:

Francisco Gracia-Navarro, Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, University of Córdoba, Campus de Rabanales, Edificio Severo-Ochoa, Planta 3, E-14014 Córdoba, Spain.
e-mail: fgracia@uco.es

[†] Belén Chanclón and Antonio J. Martínez-Fuentes contributed equally to this work.

Somatostatin (SST), cortistatin (CORT), and its receptors (sst1–5), and ghrelin and its receptors (GHS-R) are two highly interrelated neuropeptide systems with a broad range of overlapping biological actions at central, cardiovascular, and immune levels among others. Besides their potent regulatory role on GH release, its endocrine actions are highlighted by SST/CORT and ghrelin influence on insulin secretion, glucose homeostasis, and insulin resistance. Interestingly, most components of these systems are expressed at the endocrine pancreas and are actively involved in the modulation of pancreatic islet function and, consequently influence glucose homeostasis. In addition, some of them also participate in islet survival and regeneration. Furthermore, under severe metabolic condition as well as in endocrine pathologies, their expression profile is severely deregulated. These findings suggest that SST/CORT and ghrelin systems could play a relevant role in pancreatic function under metabolic and endocrine pathologies. Accordingly, these systems have been therapeutically targeted for the prevention or amelioration of certain metabolic conditions (obesity) as well as for tumor growth inhibition and/or hormonal regulation in endocrine pathologies (neuroendocrine tumors). This review focuses on the interrelationship between SST/CORT and ghrelin systems and their role in severe metabolic conditions and some endocrine disorders.

Keywords: SST, CORT, ghrelin, insulin, islet, pancreas, endocrine

INTRODUCTION

The pancreas is a physiologically and biologically complex organ organized in exocrine and endocrine compartments which are modulated by a wide variety of neuronal and hormonal signals in an integrated manner. The exocrine function of the pancreas is performed by more than 90% of the whole pancreatic tissue and is essentially composed of acinar and ductal cells that respectively, synthesize and transport enzymes crucial for nutrient digestion at the gastrointestinal tract.

The endocrine function of the pancreas is in turn achieved by distinct cell types organized in major structures called Islet of Langerhans, which are scattered throughout the organ and are in close contact with the vascular environment. At least five major different endocrine cell types have been described: glucagon-secreting alpha-cells, insulin-secreting beta-cells, somatostatin (SST)-secreting delta-cells, ghrelin-producing epsilon-cells, and pancreatic polypeptide-producing cells. The distribution and proportion of endocrine cells within the pancreatic islets varies between species (Jain and Lammert, 2009). The coordinated production, release, action, and relationship of the above-mentioned pancreatic endocrine peptides determine the constitutive metabolic homeostasis within the organism. In this sense, the endocrine dysfunction of the gland as the impairment of insulin production triggers the development of type 2 diabetes mellitus (T2DM) therefore, resulting in an abnormal regulation of blood glucose concentration with ulterior significant complications. It is widely known the close relationship between type 2 diabetes and

obesity (Venables and Jeukendrup, 2009). In this sense, in fact, obesity is a multi-factorial chronic metabolic condition that predispose to the development of T2DM and shares with the later a common feature: insulin resistance (Saltiel and Kahn, 2001). The increasing incidence of both metabolic disorders urges for the search of therapeutic targets in order to treat these pathologies and improve glucose homeostasis and insulin resistance, as well as body weight regulation. In this context, the action of the different ghrelin system components on glucose homeostasis, insulin resistance, and body weight regulation has been described and consequently, ghrelin system has been suggested as a potential drug target for the prevention or treatment of T2DM and obesity. In turn, some tissues are common targets of SST/cortistatin (CORT) and ghrelin (i.e., endocrine pancreas) and interestingly, these three molecules show a highly molecular parallelism (i.e., all peptides are processed from prepro-hormones that generate several biologically active peptides). In the present review, we analyze the literature relative to the modulation of endocrine pancreatic function by these two closely interrelated pleiotropic systems, SST/CORT, and ghrelin. Moreover, we also include its actions on glucose metabolism and insulin release as well as their possible pathophysiological role in metabolic disorders with increasing incidences as T2DM and obesity.

SST/CORT PLEIOTROPIC SYSTEM

Somatostatin was originally isolated from ovine hypothalamus based on its potent inhibitory action on pituitary growth hormone

(GH) secretion (Brazeau et al., 1973). At circulation, it appears in two biologically active forms consisting of 14 (SST-14) or 28 amino acid (aa) residues (SST-28), generated by differential post-translational processing from a common precursor molecule. Both isoforms are widely distributed in a number of organs and tissues, although they display a particular tissue-specific expression patterns. Thus, SST-14 is predominantly produced in the central nervous system and in several peripheral tissues, including the pancreas (Ballian et al., 2006), whereas SST-28 is mainly expressed by epithelial cells of the gastrointestinal tract mucosa. Such wide distribution of SST forms is consistent with its ever growing spectrum of biological and pathophysiological functions, mostly of inhibitory nature, such as inhibition of endocrine and exocrine secretions, neurotransmission, neuromodulation, gastrointestinal motility, immune system function, tumor cell growth, and pancreatic function (Patel, 1999).

A large amount of this wide biological capacity of SST is mediated via binding and activation of SST receptors, a family of five specific transmembrane proteins (named sst1–5) belonging to the superfamily of G proteins coupled receptors (GPCRs), and encoded by five distinct intronless genes (Gahete et al., 2010). All five isoforms recruit several downstream transduction signals upon SST binding such as adenylyl cyclase and calcium channels, which are two major players involved in SST inhibitory action on hormone release. Similarly to SST tissue distribution, ssts are present in abundant tissue locations and often, in SST tissue targets, several isoforms are simultaneously present in the same cell. In this context, it has been reported that ssts functionally interact with each other and even with other GPCRs to form homo- and/or heterodimers that activate different signaling cascades and consequently mediate multiple biological actions (Moller et al., 2003).

The pleiotropic activity featured by SST fits well with both its ample tissue distribution and its multiple receptors. Moreover, it can also be likely related to the existence of a highly similar peptide of the same family, CORT, which was originally discovered in frogs and subsequently in rodents and humans (de Lecea et al., 1996; Tostivint et al., 1996). Like SST, CORT is the product of an enzymatically processed precursor, CORT prepro-peptide, which shares high homology with SST precursor. SST and CORT precursors are encoded by two different genes that evolved from a common ancestral gene by a duplication mechanism (Tostivint et al., 1996; Gahete et al., 2010). Similar to that described for SST, processing of CORT precursor generates diverse mature peptides as CORT-14 and -29 in rodents and CORT-17 and -29 in humans. In addition, CORT- and SST-mature forms shares 11 aas, which include two cysteine residues responsible for their characteristic cyclic structure and the FWKT core (Phe7-Trp8-Lys9-Thr10), a crucial motif for receptor binding. Thus, their differences are located at the N- and C-terminal regions. In sum, CORT and SST sequence identity and structural homology explain well their close pharmacology, specifically, their comparable subnanomolar binding affinity to the five sst isoforms.

Although CORT was initially discovered in the brain and it is especially abundant in the cortex (where its name comes from), further reports showed that this neuropeptide is also widely distributed at peripheral tissues including gastrointestinal tract and

pancreas. Based on its ability to activate ssts, CORT exhibits almost endocrine and most non-endocrine actions of SST (Broglia et al., 2008; Gahete et al., 2008). Actually, their main functional divergences, reside in the ability of CORT to promote sleep functions, modulate locomotor activity, exert potent anti-inflammatory actions in experimental models of inflammatory and autoimmune disorders (de Lecea et al., 1996; Gonzalez-Rey and Delgado, 2008) and, its influence on atherogenesis (Gonzalez-Rey and Delgado, 2008; Liu et al., 2010; Souza-Moreira et al., 2011).

Differential actions between SST and CORT possibly reside in the ability of CORT to interact, in addition to ssts, with the Mas-related gene 2 receptor (MrgX2), a former orphan receptor originally suggested as specific for CORT. However, this receptor appears to be a quite promiscuous GPCR that also shows some specificity for proadrenomedullin and related peptides (Nothacker et al., 2005). Interestingly, CORT is also able to bind ghrelin receptor (GHS-R1a) by displacing its natural ligand from its binding sites, capacity that is not shared by SST. In this sense, it has been recently demonstrated that interaction of CORT with ghrelin system precludes CORT to be a mere SST natural analog in the regulation of endocrine secretions. Indeed, our laboratory have recently demonstrated that CORT exhibits a stimulatory role on prolactin (PRL) secretion in primates and mice, which could be blocked *in vitro* by a GHS-R1a antagonist, a biological action that is not elicited by SST (Cordoba-Chacon et al., 2011).

GHRELIN PLEIOTROPIC SYSTEM

The ghrelin gene, *GHRL*, encloses a 20-bp non-translated exon (Ex0), four coding exons (Ex1–4) and three introns, being a 28-aa native ghrelin peptide the predominant product of the 117-aa precursor pre-proghrelin (Kojima et al., 1999). Pre-proghrelin includes the signal peptide encoded by Ex1, and the coding sequence encoded by Ex2 and Ex3 which are the coding sequence of ghrelin (Seim et al., 2007). This transcript processing also generates different peptides or variants such as obestatin (of 23 aas), des-Glu14-ghrelin [matching to native ghrelin except for the deletion of one aa (Glu in the position 14)], etc. (Kineman et al., 2007; Seim et al., 2010).

Native ghrelin was originally isolated from the stomach of humans and rats based on its potent GH releasing activity (Kojima et al., 1999). Interestingly, native ghrelin has been the first natural hormone to be identified in which its third residue, usually a serine in mammals, contains the addition of a middle-chain fatty acid (*n*-octanoic acid) crucial for its biological activity. This post-translational modification is catalyzed by the ghrelin *O*-acyltransferase (GOAT; Gutierrez et al., 2008; Yang et al., 2008), a membrane bound *O*-acyltransferase located at the endoplasmic reticulum that uses fatty acids from the diet to fulfill its action (Kojima and Kangawa, 2005). Afterward, either acylated- or unacylated-proghrelin can be further processed by the prohormone convertase 1/3 (PC1/3) thus generating the acylated-ghrelin or its unacylated-ghrelin counterpart, a form of ghrelin initially considered as inactive (Zhu et al., 2006). Surprisingly, circulating unacylated-ghrelin levels are significantly higher than those of acylated-ghrelin in a proportion that depends on the study considered (Hosoda et al., 2000; Yoshimoto et al., 2002; Broglia et al., 2004; Liu et al., 2008).

Acylated-ghrelin elicits its biological actions through the GH-secretagogue receptor type-1a, GHS-R1a, previously known as an orphan receptor that mediates the GH-releasing effect of synthetic GH secretagogues, a group of peptide and non-peptide compounds with GH releasing properties. Currently, GHS-R1a is also called the ghrelin receptor based on the description of ghrelin as its natural ligand (Kojima et al., 1999).

The GHS-R gene consist of two exons whose transcription and processing originate two distinct forms of cDNAs: GHS-R1a, encoded by both exons, and a shorter form, GHS-R1b, derived from the exclusive transcription of the first exon (Howard et al., 1996; Kojima and Kangawa, 2005). The full-length of human GHS-R1a is a highly conserved protein of 366 aas that belong to the GPCR family containing seven putative membrane spanning alpha-helical segments and three intracellular and extracellular loops (Howard et al., 1996). GHS-R1a specifically recognizes the binding of acylated-ghrelin but not that of unacylated-ghrelin, whose specific receptor remains to be identified. In contrast, GHS-R1b isoform is an alternatively truncated variant of 289 aas that only possesses the first five transmembrane domains of GHS-1a (Howard et al., 1996; Kojima and Kangawa, 2005), and it was considered, until recently, to be a non-functional GHS-R isoform based on its inability to bind acylated-ghrelin. Interestingly, it has been recently described the interaction of GHS-R1b with GHS-R1a and other receptors to form heterodimers (Muccioli et al., 2007), as well as the heterodimerization of GHS-R1a with SST and dopamine receptors (Seim et al., 2010).

In terms of signal transduction, it has been described that GHS-R1a activation involves the participation of several signaling cascades including phospholipase C (PLC), protein kinase C (PKC), protein kinase A (Kojima and Kangawa, 2005) intracellular and extracellular Ca^{2+} , and mitogen-activated protein kinases (Mousseaux et al., 2006; Camina et al., 2007).

Different components of the ghrelin system have been found to be ubiquitously represented in the organism. Specifically, ghrelin was originally described to be predominantly produced by endocrine cells of the stomach submucosa (Kojima et al., 1999). In addition, it was also documented to be produced at other portions of the gastrointestinal tract from the stomach to the colon and in a wide variety of peripheral tissues like the pancreas (Kojima et al., 1999; Date et al., 2000). It has also been showed the expression of ghrelin at different locations of the central nervous system (Ueberberg et al., 2009). The wider ghrelin tissue distribution is mimicked by that of GOAT, particularly in major ghrelin-secreting tissues (Gutierrez et al., 2008; Yang et al., 2008; Sakata et al., 2009) although GOAT transcripts appear to be much lower expressed than ghrelin transcripts. However, it has been documented that a small proportion of ghrelin expressing cells devoid of GOAT expression thus suggesting and supporting that unacylated-ghrelin might show independent biological actions to that described for ghrelin (Jeffery et al., 2011) and most probably by distinct receptor and mechanisms to those recruited by ghrelin (Toshinai et al., 2006; Sato et al., 2012).

On the other hand, GHS-R1a expression has been also widely detected in tissues or organs including pancreas, liver, stomach, adipose tissue, small and large intestine, immune system, and others (Gnanapavan et al., 2002; Sun et al., 2007; Ueberberg

et al., 2009). In strikingly contrast, expression of GHS-R1b has been described to be even more extensive than that of GHS-R1a (Gnanapavan et al., 2002).

According to the wide tissue distribution of the different ghrelin system components, many physiological actions have been documented for this system. Based on the high conservation degree among species of ghrelin and its receptor sequences, it has been suggested that ghrelin system plays essential biological actions. In fact, and as mentioned earlier, acylated-ghrelin was initially identified based on its ability to stimulate GH release upon GHS-R1a coupling in a similar manner to that described for GH secretagogues (Kojima et al., 1999). Also involving GHS-R1a activation, ghrelin elicits an orexigenic role by promoting food intake or appetite (Wren et al., 2000; Druce et al., 2005, 2006) and weight gain and adiposity (Tschop et al., 2000; Wren et al., 2000, 2001). Ghrelin has also shown regulatory properties on glucose and energy homeostasis that will be revised separately. In addition to its metabolic actions, ghrelin has also been reported to exert potent anti-inflammatory actions in therapeutically relevant models of arthritis or inflammatory bowel disease (Gonzalez-Rey et al., 2006; Gonzalez-Rey and Delgado, 2008) and also influence atherogenesis (Kadoglou et al., 2012). Furthermore, ghrelin shows favorable effects on cardiovascular and gastroenteropancreatic physiology (Isgaard and Granata, 2011), as well as on the modulation of the immune system (Souza-Moreira et al., 2011). At the central nervous system, ghrelin influences memory, learning, and behavior functions (Asakawa et al., 2001; Broglio et al., 2003). Besides the above-described stimulatory effect on GH release, pituitary function is also regulated by ghrelin by stimulating the release of PRL and adrenocorticotropin (van der Lely et al., 2004; Coiro et al., 2005).

On the other hand, unacylated-ghrelin, plays both equal or opposite biological actions to that above described for acyl-ghrelin, most probably through its coupling to a still unknown receptor different from GHS-R1a, as it has been recently suggested and documented (Toshinai et al., 2006; Lear et al., 2010; Togliatto et al., 2010). Moreover, regulation of unacylated-ghrelin secretion under food restriction condition has been reported, thus supporting a not passive role for this unmodified peptide (Kirchner et al., 2009).

Regarding obestatin, this 23-aa peptide is mainly produced in the stomach and at lower level in the pancreas, spleen, testis, duodenum, jejunum, colon, and mammary gland (Ren et al., 2009). To date, although obestatin receptor remains unknown, it has been proposed that GPR39 or glucagon-like peptide-1 receptor might be potential receptors for obestatin (Granata et al., 2008; Ren et al., 2009).

ACTIONS OF SST/CORT SYSTEM AT THE ENDOCRINE PANCREAS

Somatostatin has long been known to potently modulate pancreatic function by playing a regulatory role on insulin and glucagon secretion. This tight regulation is accomplished by the coordinated action of SST biologically active forms. In this sense, SST-14 is the major product released by adult pancreatic delta-cells, whose contribution to total circulating SST accounts for nearly 5%. SST-14 immediate actions imply the paracrine regulation of other pancreatic endocrine cells. In addition, endocrine pancreatic function is

also under the control of the major circulating SST form, SST-28. In this context, it has been documented that SST-14 and SST-28 differently target pancreatic alpha- or beta-cells. Accordingly, SST-14 has been associated with the inhibition of glucagon secretion while SST-28 seems preferentially to inhibit insulin secretion (Strowski and Blake, 2008). In either case, inhibitory action of SST on both insulin and glucagon release would contribute to preserve glucose homeostasis which, in turn, retrospectively regulates SST plasma concentration. For this reason, during fasting, plasma SST level is low and increases up to twofold after meals. In such hyperglycemic conditions, insulin induces SST release and consequently shuts down its own release as a protective mechanism to prevent a rapid hypoglycemia at the post-prandial state. In contrast, SST release is also increased at low plasma glucose concentration as a consequence of the coordinated action of glucagon and L-glutamate, a co-secretion product of alpha-cells (Strowski and Blake, 2008).

The SST action on pancreatic hormones is mediated by its interaction with the different receptor isoforms, however, conflicting data about receptor expression at the pancreatic level have been published which, might be related with the different method used and/or species analyzed. In general, it is likely that endocrine pancreas expresses all five sst isoforms, being probably sst1, sst2, and sst5 those expressed in a predominant manner. Specifically, it has been demonstrated by RT-PCR that rodent pancreas expresses all sst isoforms except sst4. In turn, by double immunohistochemistry methods, it has been confirmed the expression of sst2 and sst5 in both rodent beta- and delta-cells. In humans, it has been reported a predominant expression of sst2 in alpha-cells, sst1 and sst5 in beta-cells, and sst5 in delta-cells while there is not consistent data on the expression of the rest of ssts (Strowski and Blake, 2008; Gahete et al., 2010).

In addition, and in order to ascertain the subtype receptors underlying the inhibitory effect of SST on pancreatic hormones, specific receptor agonists, and antagonists as well as *knock out* mouse models with deletion of the different ssts isoforms have been employed. These issues have been amply revised elsewhere (Strowski and Blake, 2008) and briefly, it appears that sst2 seems to mediate glucagon inhibition and sst5 looks as the main receptor mediating insulin inhibition in rodents. More recently, high expression of sst3 has been also demonstrated in mouse pancreatic islets (Regard et al., 2008). In human, by contrast, sst2 looks to be the main receptor mediating both insulin and glucagon release, although sst1 and sst5 also participate in the regulation of insulin secretion (Gahete et al., 2010). In summary, several sst isoforms would mediate the inhibitory action of SST on insulin and glucagon secretion through a mechanism that indubitably is species-dependent, and will essentially depend on the receptor expression pattern.

In relation to CORT and its role on pancreatic function, only a few studies are available. Particularly and similarly to SST, CORT expression has been reported at the endocrine pancreas and essentially mimics its inhibitory action on insulin secretion under physiological and certain pathological conditions (Grottoli et al., 2006; Broglio et al., 2008), although the molecular mechanism underlying such inhibitory action is still unclear. In addition, it should be highlighted that CORT is also able to elicit distinct

functions to that showed by SST mainly through its coupling to the ghrelin receptor (GHS-R1), as it has been recently documented for others endocrine secretions (Cordoba-Chacon et al., 2011).

ACTIONS OF GHRELIN SYSTEM AT THE ENDOCRINE PANCREAS

After ghrelin discovery, it was reported that pancreatic epsilon-cells are the major source of ghrelin forms during fetal life until early post-natal period (Wierup et al., 2002; Chanoine and Wong, 2004). After this period, the major source of ghrelin production is the stomach submucosa (Kojima et al., 1999) while, the pancreas turns on a secondary source of ghrelin production with low level of ghrelin receptor expression (Veldhuis and Bowers, 2010). At the pancreas, the major source of ghrelin resides into epsilon-cells (Wierup et al., 2002, 2004; Prado et al., 2004) although it appears that is also produced by beta-cells in humans (Volante et al., 2002) and by glucagon-producing alpha-cells in human and rats (Date et al., 2002). In any case and in terms of ghrelin production, it has been described that during adult life the 65–90% of circulating ghrelin corresponds to that synthesized and released by the stomach, being the rest derived from other tissues including the pancreas and the intestine (Al Massadi et al., 2011).

Endocrine ghrelin actions at the pancreas involve inhibition of SST release by delta-cells, and stimulation of glucagon release by alpha-cells (Qader et al., 2005, 2008; Veldhuis and Bowers, 2010; Chuang et al., 2011) as well as inhibition of pancreatic polypeptide release by PP cells (Qader et al., 2008; Kumar et al., 2010), being all cells types in which GHS-R expression has been documented (Wierup et al., 2002, 2004; Kageyama et al., 2005; Dezaki et al., 2008; Granata et al., 2010a). On the other hand, SST and glucagon have also been shown to elicit a reciprocal modulation of ghrelin production (**Figure 2**). Furthermore, it has been reported that insulin and SST inhibit ghrelin release while glucagon inhibits its secretion in rodent although stimulate ghrelin release in humans (Qader et al., 2008).

Although ghrelin effect on insulin secretion is supported by an increasing number of reports, its precise role is nevertheless controversial since either stimulatory or inhibitory actions has been reported depending on the ghrelin doses used and/or experimental conditions employed as recently reviewed by Granata et al. (2010a,b). Specifically, the ghrelin stimulatory effect of insulin release is mainly mediated by an increase of cytosolic Ca^{2+} upon GHS-R activation, while the participation of a different receptor has been proposed based on the observed stimulatory action of both acylated- and unacylated-ghrelin on insulin release in a hamster beta-cell line devoid of GHS-R expression (Granata et al., 2007). In addition, it has also been described that ghrelin administration increases insulin release in rats under conditions of low blood insulin as a consequence of a 90% pancreatectomy (Kerem et al., 2009). Reciprocally, insulin inhibits ghrelin expression (Veldhuis and Bowers, 2010) and more recently it has been proposed that insulin might act as an inhibitor of pancreatic ghrelin activation by inhibition of GOAT expression (An et al., 2011).

In clear contrast to the above stimulatory role of ghrelin on insulin secretion, the ghrelin inhibitory action has been prevalently reported and examined in several biological and animal models

including cultured pancreata, cultured islets and heterologous cell models (Granata et al., 2010a; Dezaki et al., 2011), as well as by using several methodological approaches. Overall, it has been described that ghrelin administration significantly reduces insulin secretion (Broglio et al., 2001; Tong et al., 2010), and this action was blocked in the presence of a higher dose of unacylated-ghrelin, suggesting the participation of a receptor distinct to GHS-R on insulin secretion modulation (Qader et al., 2008). Reduction of insulin level by ghrelin administration triggers a concomitant elevation of blood glucose levels in a dose-dependent manner as well as deterioration of insulin sensitivity during glucose tolerance, as it have been described in both humans and rodents (Korbonits and Grossman, 2004; Dezaki et al., 2008; Tong et al., 2010; Sato et al., 2012). The hyperglycemic action of ghrelin, but not by unacylated-ghrelin in rodents, was blocked by simultaneous administration of GHS-R antagonist thus revealing the specific participation of GHS-R in the hyperglycemic role of ghrelin (Dezaki et al., 2008). In addition, GHS-R deletion also reduces blood glucose level and significantly enhances insulin sensitivity (Longo et al., 2008; Qi et al., 2011). Importantly, the involvement of GH (a long time known hyperglycemic hormone) has been excluded from the hyperglycemic effect of ghrelin administration based on elevated plasma glucose levels observed in response to exogenous ghrelin administration in GH-deficient mice (Dezaki et al., 2008) and subjects with GH-deficiency (Vestergaard et al., 2008). Similarly, ghrelin hyperglycemic effect have been reported to be independent of an insulin resistance induction as evidenced by insulin and glucose tolerance tests after ghrelin administration (Dezaki et al., 2008).

In order to ascertain whether the insulinostatic action of ghrelin is due to the peptide derived from the stomach or other sources as the pancreas, GHS-R antagonist was administered to gastrectomized animals and a significant increase in insulin secretion was observed in a similar extend to that observed in normal rats. This observation suggests that intra-islet ghrelin may locally act on insulin production regulation (Dezaki et al., 2007). However, Bando et al. (2012) recently reported that intra-islet ghrelin does not play a major local role on the regulation of insulin release *in vivo*, based on their findings on transgenic mice in which ghrelin and GOAT were overexpressed in beta-cells. The discrepancy between these two later studies may reside on the different ghrelin concentration reached at the surrounding microenvironment of beta-cells.

In addition to the regulatory role of ghrelin on pancreatic function, it has also been described that acylated- and unacylated-ghrelin as well as obestatin elicit a protective role by preventing apoptosis on pancreatic islet in rodents, humans, and several beta-cell lines (Granata et al., 2012b). In this sense, it has been reported that beta-cell destruction elicited by streptozotocin administration was precluded by ghrelin by increasing both beta-cell mass and insulin release in rats (Irako et al., 2006). Furthermore, ghrelin and obestatin also protect against apoptosis induced by serum starvation and cytokines in both human islets and beta-cell lines (Granata et al., 2007, 2008, 2010a). In well agreement with this, ghrelin and obestatin exert their mitogenic effect by increasing the number of beta-cells in 90% pancrea-tectomized rats (Kerem et al., 2009) and in a hamster beta-cells

line (Granata et al., 2010a), proliferative action that was blocked by administration of ghrelin antagonist or ghrelin antibody (Kerem et al., 2009; Granata et al., 2010a). These findings suggest that a cross-talk between ghrelin and obestatin may exist (Granata et al., 2008).

ROLE OF SST/CORT SYSTEM IN T2DM AND OBESITY

They are not many reports on the role of SST/CORT in situations with altered metabolic conditions. In this sense, an increase in the number of SST-producing cells in T2DM patients has been recently described, although circulating SST remains in the same level to that depicted by control subjects. However, in an experimental model of obese and spontaneously diabetic mice, SST content is significantly increased (Strowski and Blake, 2008). In this scenario, the well established inhibitory actions of SST on pancreatic function, particularly on insulin and glucagon secretion (Figure 1) as well as its inhibitory action on intestinal glucose absorption, predicted its use as a key tool to potentially regulate glucose homeostasis and insulin sensitivity in diabetes and obesity (Hansen et al., 2004; Tzotzas et al., 2008). Indeed, initial studies evaluated SST role on insulin hypersecretion as well as in hyperinsulinemia associated with obesity, two conditions that were described to induce insulin resistance (Janson and Oberg, 1999; Boehm, 2003). Consequently, significant reductions in body weight and insulin release as well as an improvement of insulin sensitivity were observed in obese patients treated with synthetic SST analogs (Boehm and Lustig, 2002; Velasquez-Mieyer et al., 2004; Lustig et al., 2006; Tzotzas et al., 2008), which were originally developed as a consequence of the SST short half-life. Similarly to SST, it has also been reported an inhibitory action of CORT on insulin release in patients with acromegaly or prolactinoma (Grotoli et al., 2005). In relation to CORT, and based on its described anti-inflammatory properties, it would be of interest to explore its role on the inflammatory signaling that occurs during obesity conditions.

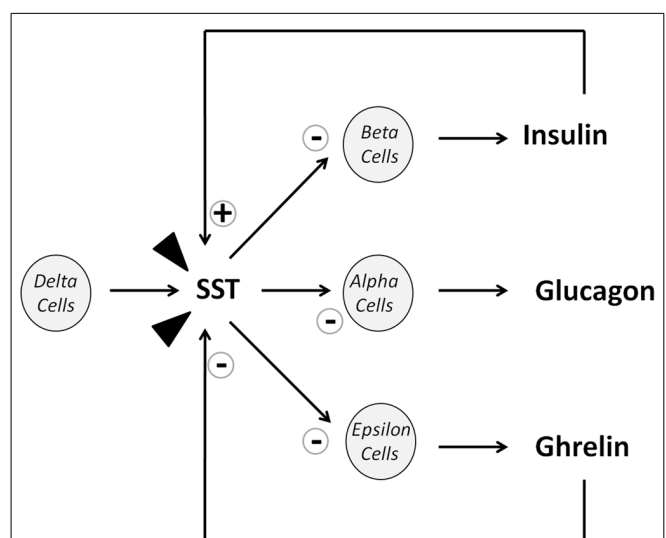
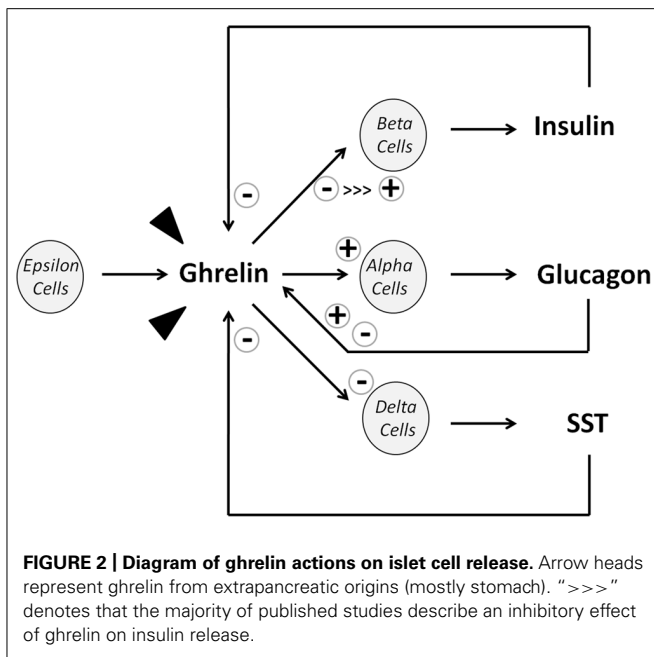


FIGURE 1 | Diagram of SST actions on islet cell release. Arrow heads represent SST from extrapancreatic origins (mostly intestinal).



More recently, the effect of a multi-ligand SST analog (pasireotide) on hormones that mediate glucose homeostasis has been described in healthy volunteers (Golor et al., 2012; Shenouda et al., 2012). Accordingly, based on the high binding affinity for four of the five SST receptor subtypes (sst1–3, and sst5) elicited by pasireotide, it has been administered to healthy subjects and an elevation of blood glucose has been observed mainly as a consequence of its inhibitory action on both insulin and glucagon release (Shenouda et al., 2012). Similar hyperglycemic effect of pasireotide has been observed in clinical trials in which pasireotide administration was evaluated on patients with endocrine pathologies as Cushing's disease, acromegaly, and neuroendocrine tumors (NETs). In these pathologies, hyperglycemia might be further worsened in base to their inherent hormonal nature (Boscaro et al., 2009; Petersenn et al., 2010; Colao et al., 2012). Furthermore, variable sst1–5 expression has been extensively documented and consequently SST analogs have been classically used after adenoma or tumor resection. Lastly, SST analogs have been used as a first option therapy in selected patients upon its ability to reduce hormonal release and/or to inhibit tumor mass progression. In these cases, alterations in glucose homeostasis as well as impaired insulin resistance has been well documented as a secondary effect to their characteristic underlying hormonal secretion (Resmini et al., 2009; Shenouda et al., 2012).

In different series of acromegalic patients, a significant prevalence of impaired glucose metabolism and diabetes mellitus has been described, a consequence that is believed to be originated by the excess GH (van der Hoek et al., 2005; Espinosa-de-los-Monteros et al., 2011; Fieffe et al., 2011; Kinoshita et al., 2011). In such GH hypersecreting conditions, the universal sst binding profile of pasireotide and its higher efficacy by lowering GH release more significantly than sst2 preferential or specific SST analogs (octreotide and lanreotide) granted its therapeutical use. However, as mentioned above in these subjects, the risk of hyperglycemia

increases as a common adverse event originated by the normalization of GH and IGF-1 levels as well as the inhibition of insulin release by SST administration (Resmini et al., 2009).

Somatostatin analogs have also been applied in the management of NET suffering patients in which, similarly to acromegalic individuals, an altered glucose tolerance has been documented (Cirillo, 2010). Such altered glucose tolerance may occur as a consequence of hormonal dysregulation or pancreatic resection (Resmini et al., 2009; Jawiarczyk et al., 2012).

Hypercortisolism condition, a distinctive characteristic of Cushing's disease, also leads to hyperglycemia and reduced glucose tolerance and as a result, in an increase of the prevalence of diabetes in this pathology (Mazziotti et al., 2009, 2011; Resmini et al., 2009). Furthermore, hyperglycemia persists even when cortisol level declines by administration of SST analogs, i.e., pasireotide as it has been recently reported (Colao et al., 2012).

In sum, hyperglycemia conditions occur in an elevated proportion of individuals suffering of acromegaly, Cushing's disease or NET and accordingly, it has been proposed that regular blood glucose testing and insulin analogs will be required, particularly when SST analogs are therapeutically used in these pathologies (Resmini et al., 2009; Colao et al., 2012).

ROLE OF GHRELIN SYSTEM IN T2DM AND OBESITY

As mentioned earlier, a growing body of studies supports the inhibitory role of ghrelin on insulin release *in vivo* and *in vitro* and its influence on glucose tolerance. Accordingly, it has been proposed that the antagonism of ghrelin system components could improve glucose homeostasis and/or beta-cell function under certain metabolic disorders as T2DM, a complex disease with a strong genetic, behavioral, and environmental background that is characterized by two distinctively conditions: insulin resistance and progressive beta-cell dysfunction. In T2DM, beta-cells become unable to adequately increase insulin release to compensate insulin resistance and consequently leading to a situation of hyperglycemia. It is well known the close association between T2DM and obesity in terms of metabolic imbalance and their common features, insulin resistance, in which ghrelin system could be of relevance based on its ability to modulate both glucose homeostasis and weight loss (Esler et al., 2007).

Under normal metabolic conditions, circulating ghrelin and plasma glucose concentrations are inversely related. In fact, ghrelin levels are increased under fasting conditions or immediately before meals and significantly decreased after feeding (Angelidis et al., 2010). Obviously, the meal-related pattern of ghrelin is also opposite to that depicted by insulin and consequently the fall of ghrelin at post-prandial state has been argued to partially depend on the rise of insulin release after food intake (Solomon et al., 2008). Accordingly, the tight relationship between ghrelin and insulin also relies in the general assumption that insulin elicits a negative action on both plasma acylated- and unacylated-ghrelin concentration (Saad et al., 2002; McLaughlin et al., 2004), while administration of acylated-ghrelin results in insulin resistance (Gauna and van der Lely, 2005).

In subjects affected by T2DM and consequently resistant to insulin, it has been showed that blood ghrelin concentration was chronically lower than that observed in healthy subjects even when

age, sex, and body mass index (BMI) were adjusted, probably as a direct effect of insulin on ghrelin-producing cells (Poykko et al., 2003; Angelidis et al., 2010; Verhulst and Depoortere, 2012). Based on the influence of ghrelin on insulin release and glucose homeostasis, it has been suggested that ghrelin antagonism could be of interest to treat T2DM and related metabolic pathologies. In this context, it has been shown that deletion of ghrelin gene promotes insulin release and ameliorates glucose intolerance and hyperglycemia in a diabetic and obese mice model (Sun et al., 2006). In well agreement with this, GHS-R ablation also improves insulin sensitivity (Gomez et al., 2009). Likewise, it has also been documented an improvement of glucose homeostasis in streptozotocin-induced diabetic rats treated with obestatin (Granata et al., 2010b) as well as a reduction in insulin resistance in mice fed with a high fat diet (Granata et al., 2012a).

On the other hand, obesity conditions have been associated with some ghrelin and GHS-R gene variations although some discrepancies exist depending on studies and population considered (Pantel et al., 2006; Liu et al., 2007; Ukkola, 2011). In this sense, available data are still inconclusive and might be limited by some relatively small analyzed cohorts that might restrict the power of association.

However, it has been well documented that under obesity conditions plasma ghrelin levels negatively correlate with BMI and consequently with factors or parameters that are elevated in obesity such as insulin, leptin, and fat mass (Tschop et al., 2001). In this sense a chronic lower ghrelin plasma concentration in obese children and adults has been reported in comparison with those of age-matched lean controls (Tschop et al., 2001; Reinehr et al., 2008; Schellekens et al., 2010). Similar data have been cited for Pima Indians, a population reported with the highest prevalence rates of obesity and T2DM when compared with Caucasians (Tschop et al., 2001). Similarly to that reported under normal metabolic condition, ghrelin also elicits a meal-related pattern although under obesity conditions the fall of ghrelin level at post-prandial state is less pronounced. Such downregulation might be a consequence of elevated fasting insulin or leptin levels observed in obesity (Baragli et al., 2011). In this sense, it has also been suggested that the decreased secretion of ghrelin, could be responsible for the concomitant decreased levels of circulating GH observed in obese individuals (Maccario et al., 2000; Tschop et al., 2001). More recently, the decreased ghrelin concentration observed in obesity could be an adaptive mechanism to maintain energy homeostasis has also been proposed (Tschop et al., 2001). In rodents, diminished ghrelin levels have been found at tissue level as well as a significant reduction in plasma ghrelin concentration and synthesis in obesity conditions induced by diet (Sahin et al., 2011; Aydin et al., 2012).

Targeting ghrelin system components by different pharmacological, immunological, and genetic approaches have been addressed in order to promote weight loss and to improve obesity conditions (i.e., insulin resistance). Thus, some studies evaluated pharmacological approaches to block or neutralize either ghrelin or its receptor under diet-induced obesity and how these methods ameliorate obesity condition by reducing appetite or food intake, and ultimately inducing weight loss (Wortley et al., 2005; Schellekens et al., 2010; Briggs and Andrews, 2011). Another set of

studies, examined the protection of ghrelin system against rapid weight gain by exposure to a high fat diet by knocking out either ghrelin (Wortley et al., 2005) or GHS-R (Castaneda et al., 2010). In these studies, an improvement of glucose tolerance was observed even though there is no effect on body weight (Zigman et al., 2005; Longo et al., 2008). Similar data were obtained in a genetically obese mice model (ob/ob; leptin deficient) in which the improvement of insulin sensitivity and glucose homeostasis was attributed to ghrelin although the obese phenotype remains unchanged (Sun et al., 2006).

In addition, it has also been proposed that GOAT by a specific inhibitor could be a potential treatment against obesity by inhibiting ghrelin acylation and consequently avoid weight gain (Gualillo et al., 2008; Yang et al., 2008; Gomez et al., 2009; Barnett et al., 2010).

On the other hand, diet-induced weight loss elicits an increase in circulating ghrelin levels thus normalizing them until near optimal concentration, rise that probably may hamper the sustained weight loss (Cummings et al., 2002; Hansen et al., 2002). In cases of morbid obesity, a more drastic method as bariatric surgery has been employed in order to reduce metabolic complications associated to obesity. Interestingly and contrary to that reported in diet-induced weight loss, after bariatric surgery ghrelin level significantly decreases and insulin sensitivity is rapidly restored, thus improving the associated diabetic state (Beckman et al., 2010; Hillman et al., 2011). In this context, sustained low ghrelin level reached by this surgical procedure precludes or delays weight gain by reducing hunger, an effect that is not observed in procedures as weight loss by diet modification in which ghrelin levels gradually normalizes with a consequent weight gain. On the other hand, in morbid obese patients, it has been suggested that equimolar administration of acylated- and unacylated-ghrelin also improve insulin sensitivity (Kiewiet et al., 2009).

Unfortunately, there is not yet a ghrelin system based therapy that ensures a sustained weight loss, although ghrelin antagonist and/or GOAT inhibitors may be considerate good therapeutic candidates for the treatment of T2DM and obesity.

CONCLUSION

The complex relationship of ligand–receptor architecture of SST/CORT and ghrelin systems is complemented by the functional relevance of their common tissue targets. Indeed, besides their opposite influence on GH release at the pituitary level, SST/CORT and ghrelin systems act on the same cellular target to influence common and relevant biological actions as it is the case of their interactions on beta cell function and survival as well as on glucose homeostasis and insulin resistance. However, the underlying molecular mechanisms of these actions have not been fully elucidated yet. Interestingly, different and severe metabolic dysfunctions as T2DM and obesity have been described to modulate their circulating levels and the expression of some components of both systems at hypothalamic, pituitary, or pancreatic level. In sum, there are an increasing number of evidences that support a potential contribution of SST/CORT and ghrelin system components in the endocrine pancreas dysfunction in prevalent neuroendocrine-metabolic pathologies (T2DM and obesity) which suggest that these systems could be considered as

future valuable therapeutic targets for the prevention or treatment of such metabolic disorders. In this sense, future research will be of particular importance in order to ascertain whether SST/CORT and ghrelin systems and its receptors will act at pancreatic islets under physiological and pathological conditions. Likewise, the

underlying molecular mechanisms as well as the precise role and the contribution of islet derived-SST, -CORT, and -ghrelin in the pancreatic endocrine deregulation and/or the resulting insulin resistance under severe metabolic conditions should be investigated.

REFERENCES

- Al Massadi, O., Tschop, M. H., and Tong, J. (2011). Ghrelin acylation and metabolic control. *Peptides* 32, 2301–2308.
- An, W., Li, Y., Xu, G., Zhao, J., Xiang, X., Ding, L., Li, J., Guan, Y., Wang, X., Tang, C., Li, X., Mulholland, M., and Zhang, W. (2011). Modulation of ghrelin O-acyltransferase expression in pancreatic islets. *Cell. Physiol. Biochem.* 26, 707–716.
- Angelidis, G., Valotassiou, V., and Georgoulis, P. (2010). Current and potential roles of ghrelin in clinical practice. *J. Endocrinol. Invest.* 33, 823–838.
- Asakawa, A., Inui, A., Kaga, T., Yuzuriha, H., Nagata, T., Fujimiyama, M., Katsura, G., Makino, S., Fujino, M. A., and Kasuga, M. (2001). A role of ghrelin in neuroendocrine and behavioral responses to stress in mice. *Neuroendocrinology* 74, 143–147.
- Aydin, S., Sahin, I., Ozkan, Y., Dag, E., Gunay, A., Guzel, S. P., Catak, Z., and Ozercan, M. R. (2012). Examination of the tissue ghrelin expression of rats with diet-induced obesity using radioimmunoassay and immunohistochemical methods. *Mol. Cell. Biochem.* 365, 165–173.
- Ballian, N., Brunnicardi, F. C., and Wang, X. P. (2006). Somatostatin and its receptors in the development of the endocrine pancreas. *Pancreas* 33, 1–12.
- Bando, M., Iwakura, H., Ariyasu, H., Hosoda, H., Yamada, G., Hosoda, K., Adachi, S., Nakao, K., Kangawa, K., and Akamizu, T. (2012). Transgenic overexpression of intrasit ghrelin does not affect insulin secretion or glucose metabolism in vivo. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 302, E403–E408.
- Baragli, A., Lanfranco, F., Allasia, S., Granata, R., and Ghigo, E. (2011). Neuroendocrine and metabolic activities of ghrelin gene products. *Peptides* 32, 2323–2332.
- Barnett, B. P., Hwang, Y., Taylor, M. S., Kirchner, H., Pfluger, P. T., Bernard, V., Lin, Y. Y., Bowers, E. M., Mukherjee, C., Song, W. J., Longo, P. A., Leahy, D. J., Hussain, M. A., Tschop, M. H., Boeke, J. D., and Cole, P. A. (2010). Glucose and weight control in mice with a designed ghrelin O-acyltransferase inhibitor. *Science* 330, 1689–1692.
- Beckman, L. M., Beckman, T. R., and Earthman, C. P. (2010). Changes in gastrointestinal hormones and leptin after Roux-en-Y gastric bypass procedure: a review. *J. Am. Diet. Assoc.* 110, 571–584.
- Boehm, B. O. (2003). The therapeutic potential of somatostatin receptor ligands in the treatment of obesity and diabetes. *Expert Opin. Investig. Drugs* 12, 1501–1509.
- Boehm, B. O., and Lustig, R. H. (2002). Use of somatostatin receptor ligands in obesity and diabetic complications. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 16, 493–509.
- Boscaro, M., Ludlam, W. H., Atkinson, B., Glusman, J. E., Petersenn, S., Reincke, M., Snyder, P., Tabarin, A., Biller, B. M., Findling, J., Melmed, S., Darby, C. H., Hu, K., Wang, Y., Freda, P. U., Grossman, A. B., Frohman, L. A., and Bertherat, J. (2009). Treatment of pituitary-dependent Cushing's disease with the multireceptor ligand and somatostatin analog pasireotide (SOM230): a multicenter, phase II trial. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94, 115–122.
- Brazeau, P., Vale, W., Burgus, R., Ling, N., Butcher, M., Rivier, J., and Guillemin, R. (1973). Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science* 179, 77–79.
- Briggs, D. I., and Andrews, Z. B. (2011). Metabolic status regulates ghrelin function on energy homeostasis. *Neuroendocrinology* 93, 48–57.
- Broglio, F., Arvat, E., Benso, A., Gottero, C., Muccioli, G., Papotti, M., Van Der Lely, A. J., Deghenghi, R., and Ghigo, E. (2001). Ghrelin, a natural GH secretagogue produced by the stomach, induces hyperglycemia and reduces insulin secretion in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 5083–5086.
- Broglio, F., Gottero, C., Arvat, E., and Ghigo, E. (2003). Endocrine and non-endocrine actions of ghrelin. *Horm. Res.* 59, 109–117.
- Broglio, F., Gottero, C., Prodham, F., Gauna, C., Muccioli, G., Papotti, M., Abribat, T., Van Der Lely, A. J., and Ghigo, E. (2004). Non-acylated ghrelin counteracts the metabolic but not the neuroendocrine response to acylated ghrelin in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89, 3062–3065.
- Broglio, F., Grottoli, S., Arvat, E., and Ghigo, E. (2008). Endocrine actions of cortistatin: in vivo studies. *Mol. Cell. Endocrinol.* 286, 123–127.
- Camina, J. P., Lodeiro, M., Ischenko, O., Martini, A. C., and Casanueva, F. F. (2007). Stimulation by ghrelin of p42/p44 mitogen-activated protein kinase through the GHS-R1a receptor: role of G-proteins and beta-arrestins. *J. Cell. Physiol.* 213, 187–200.
- Castaneda, T. R., Tong, J., Datta, R., Culler, M., and Tschop, M. H. (2010). Ghrelin in the regulation of body weight and metabolism. *Front. Neuroendocrinol.* 31, 44–60.
- Chanoine, J. P., and Wong, A. C. (2004). Ghrelin gene expression is markedly higher in fetal pancreas compared with fetal stomach: effect of maternal fasting. *Endocrinology* 145, 3813–3820.
- Chuang, J. C., Sakata, I., Kohno, D., Perello, M., Osborne-Lawrence, S., Repa, J. J., and Zigman, J. M. (2011). Ghrelin directly stimulates glucagon secretion from pancreatic alpha-cells. *Mol. Endocrinol.* 25, 1600–1611.
- Cirillo, F. (2010). Role of somatostatin analogs in the management of neuroendocrine tumors. *Tumori* 96, 191–197.
- Coiro, V., Sacconi-Jotti, G., Minelli, R., Melani, A., Milli, B., Manfredi, G., Volpi, R., and Chiodera, P. (2005). Adrenocorticotropin/cortisol and arginine-vasopressin secretory patterns in response to ghrelin in normal men. *Neuroendocrinology* 81, 103–106.
- Colao, A., Petersenn, S., Newell-Price, J., Findling, J. W., Gu, F., Maldonado, M., Schoenherr, U., Mills, D., Salgado, L. R., and Biller, B. M. (2012). A 12-month phase 3 study of pasireotide in Cushing's disease. *N. Engl. J. Med.* 366, 914–924.
- Cordoba-Chacon, J., Gahete, M. D., Pozo-Salas, A. I., Martinez-Fuentes, A. J., de Lecea, L., Gracia-Navarro, F., Kineman, R. D., Castano, J. P., and Luque, R. M. (2011). Cortistatin is not a somatostatin analogue but stimulates prolactin release and inhibits GH and ACTH in a gender-dependent fashion: potential role of ghrelin. *Endocrinology* 152, 4800–4812.
- Cummings, D. E., Weigle, D. S., Frayo, R. S., Breen, P. A., Ma, M. K., Dellinger, E. P., and Purnell, J. Q. (2002). Plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric bypass surgery. *N. Engl. J. Med.* 346, 1623–1630.
- Date, Y., Kojima, M., Hosoda, H., Sawaguchi, A., Mondal, M. S., Suganuma, T., Matsukura, S., Kangawa, K., and Nakazato, M. (2000). Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology* 141, 4255–4261.
- Date, Y., Nakazato, M., Hashiguchi, S., Dezaki, K., Mondal, M. S., Hosoda, H., Kojima, M., Kangawa, K., Arima, T., Matsuo, H., Yada, T., and Matsukura, S. (2002). Ghrelin is present in pancreatic alpha-cells of humans and rats and stimulates insulin secretion. *Diabetes* 51, 124–129.
- de Lecea, L., Criado, J. R., Prospero-Garcia, O., Gautvik, K. M., Schweitzer, P., Danielson, P. E., Dunlop, C. L., Siggins, G. R., Henriksen, S. J., and Sutcliffe, J. G. (1996). A cortical neuropeptide with neuronal depressant and sleep-modulating properties. *Nature* 381, 242–245.
- Dezaki, K., Damdindorj, B., Sone, H., Dyachok, O., Tengholm, A., Gylfe, E., Kurashina, T., Yoshida, M., Kakei, M., and Yada, T. (2011). Ghrelin attenuates cAMP-PKA signaling to evoke insulinostatic cascade in islet beta-cells. *Diabetes* 60, 2315–2324.
- Dezaki, K., Kakei, M., and Yada, T. (2007). Ghrelin uses Galphai2 and activates voltage-dependent K⁺ channels to attenuate glucose-induced Ca²⁺ signaling and insulin release in islet beta-cells: novel signal transduction of ghrelin. *Diabetes* 56, 2319–2327.
- Dezaki, K., Sone, H., and Yada, T. (2008). Ghrelin is a physiological regulator of insulin release in pancreatic islets and glucose homeostasis. *Pharmacol. Ther.* 118, 239–249.
- Druce, M. R., Neary, N. M., Small, C. J., Milton, J., Monteiro, M., Patterson, M., Ghatge, M. A., and Bloom, S. R. (2006). Subcutaneous administration of ghrelin stimulates energy intake in healthy lean human

- volunteers. *Int. J. Obes. (Lond.)* 30, 293–296.
- Druce, M. R., Wren, A. M., Park, A. J., Milton, J. E., Patterson, M., Frost, G., Ghatei, M. A., Small, C., and Bloom, S. R. (2005). Ghrelin increases food intake in obese as well as lean subjects. *Int. J. Obes. (Lond.)* 29, 1130–1136.
- Esler, W. P., Rudolph, J., Claus, T. H., Tang, W., Barucci, N., Brown, S. E., Bullock, W., Daly, M., Decarr, L., Li, Y., Milardo, L., Molstad, D., Zhu, J., Gardell, S. J., Livingston, J. N., and Sweet, L. J. (2007). Small-molecule ghrelin receptor antagonists improve glucose tolerance, suppress appetite, and promote weight loss. *Endocrinology* 148, 5175–5185.
- Espinosa-de-los-Monteros, A. L., Gonzalez, B., Vargas, G., Sosa, E., and Mercado, M. (2011). Clinical and biochemical characteristics of acromegalic patients with different abnormalities in glucose metabolism. *Pituitary* 14, 231–235.
- Fieffe, S., Morange, I., Petrossians, P., Chanson, P., Rohmer, V., Cortet, C., Borson-Chazot, F., Brue, T., and Delemer, B. (2011). Diabetes in acromegaly, prevalence, risk factors, and evolution: data from the French Acromegaly Registry. *Eur. J. Endocrinol.* 164, 877–884.
- Gahete, M. D., Cordoba-Chacon, J., Duran-Prado, M., Malagon, M. M., Martinez-Fuentes, A. J., Gracia-Navarro, F., Luque, R. M., and Castano, J. P. (2010). Somatostatin and its receptors from fish to mammals. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1200, 43–52.
- Gahete, M. D., Duran-Prado, M., Luque, R. M., Martinez-Fuentes, A. J., Vazquez-Martinez, R., Malagon, M. M., and Castano, J. P. (2008). Are somatostatin and cortistatin two siblings in regulating endocrine secretions? In vitro work ahead. *Mol. Cell. Endocrinol.* 286, 128–134.
- Gauna, C., and van der Lely, A. J. (2005). Somatostatin, cortistatin, ghrelin and glucose metabolism. *J. Endocrinol. Invest.* 28, 127–131.
- Gnanapavan, S., Kola, B., Bustin, S. A., Morris, D. G., Mcgee, P., Fairclough, P., Bhattacharya, S., Carpenter, R., Grossman, A. B., and Korbonits, M. (2002). The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, 2988.
- Golor, G., Hu, K., Ruffin, M., Buchelt, A., Bouillaud, E., Wang, Y., and Maldonado, M. (2012). A first-in-man study to evaluate the safety, tolerability, and pharmacokinetics of pasireotide (SOM230), a multireceptor-targeted somatostatin analog, in healthy volunteers. *Drug Des. Dev. Ther.* 6, 71–79.
- Gomez, R., Lago, F., Gomez-Reino, J. J., and Gualillo, O. (2009). Novel factors as therapeutic targets to treat diabetes. Focus on leptin and ghrelin. *Expert Opin. Ther. Targets* 13, 583–591.
- Gonzalez-Rey, E., Chorny, A., and Delgado, M. (2006). Therapeutic action of ghrelin in a mouse model of colitis. *Gastroenterology* 130, 1707–1720.
- Gonzalez-Rey, E., and Delgado, M. (2008). Emergence of cortistatin as a new immunomodulatory factor with therapeutic potential in immune disorders. *Mol. Cell. Endocrinol.* 286, 135–140.
- Granata, R., Baragli, A., Settanni, F., Scarlatti, F., and Ghigo, E. (2010a). Unraveling the role of the ghrelin gene peptides in the endocrine pancreas. *J. Mol. Endocrinol.* 45, 107–118.
- Granata, R., Volante, M., Settanni, F., Gauna, C., Ghe, C., Annunziata, M., Deidda, B., Gesmundo, I., Aribat, T., Van Der Lely, A. J., Muccioli, G., Ghigo, E., and Papotti, M. (2010b). Unacylated ghrelin and obestatin increase islet cell mass and prevent diabetes in streptozotocin-treated newborn rats. *J. Mol. Endocrinol.* 45, 9–17.
- Granata, R., Gallo, D., Luque, R. M., Baragli, A., Scarlatti, F., Grande, C., Gesmundo, I., Cordoba-Chacon, J., Bergandi, L., Settanni, F., Togliatto, G., Volante, M., Garetto, S., Annunziata, M., Chanclón, B., Gargantini, E., Rocchietto, S., Matera, L., Datta, G., Morino, M., Brizzi, M. F., Ong, H., Camussi, G., Castano, J. P., Papotti, M., and Ghigo, E. (2012a). Obestatin regulates adipocyte function and protects against diet-induced insulin resistance and inflammation. *FASEB J.* 26, 3393–3411.
- Granata, R., Settanni, F., Julien, M., Nano, R., Togliatto, G., Trombetta, A., Gallo, D., Piemonti, L., Brizzi, M. F., Aribat, T., Van Der Lely, A. J., and Ghigo, E. (2012b). Des-acyl ghrelin fragments and analogues promote survival of pancreatic beta-cells and human pancreatic islets and prevent diabetes in streptozotocin-treated rats. *J. Med. Chem.* 55, 2585–2596.
- Granata, R., Settanni, F., Biancone, L., Trovato, L., Nano, R., Bertuzzi, F., Destefanis, S., Annunziata, M., Martinetti, M., Catapano, F., Ghe, C., Isgaard, J., Papotti, M., Ghigo, E., and Muccioli, G. (2007). Acylated and unacylated ghrelin promote proliferation and inhibit apoptosis of pancreatic beta-cells and human islets: involvement of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A, extracellular signal-regulated kinase 1/2, and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling. *Endocrinology* 148, 512–529.
- Granata, R., Settanni, F., Gallo, D., Trovato, L., Biancone, L., Cantaluppi, V., Nano, R., Annunziata, M., Campiglia, P., Arnoletti, E., Ghe, C., Volante, M., Papotti, M., Muccioli, G., and Ghigo, E. (2008). Obestatin promotes survival of pancreatic beta-cells and human islets and induces expression of genes involved in the regulation of beta-cell mass and function. *Diabetes* 57, 967–979.
- Grottoli, S., Celleno, R., Gasco, V., Pivonello, R., Caramella, D., Barreca, A., Ragazzoni, F., Pigliaru, F., Alberti, D., Ferrara, R., and Angeletti, G. (2005). Efficacy and safety of 48 weeks of treatment with octreotide LAR in newly diagnosed acromegalic patients with macroadenomas: an open-label, multicenter, non-comparative study. *J. Endocrinol. Invest.* 28, 978–983.
- Grottoli, S., Gasco, V., Broglio, F., Baldelli, R., Ragazzoni, F., Gallenca, F., Mainolfi, A., Prodám, F., Muccioli, G., and Ghigo, E. (2006). Cortistatin-17 and somatostatin-14 display the same effects on growth hormone, prolactin, and insulin secretion in patients with acromegaly or prolactinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91, 1595–1599.
- Gualillo, O., Lago, F., and Dieguez, C. (2008). Introducing GOAT: a target for obesity and anti-diabetic drugs? *Trends Pharmacol. Sci.* 29, 398–401.
- Gutierrez, J. A., Solenberg, P. J., Perkins, D. R., Willency, J. A., Knierman, M. D., Jin, Z., Witcher, D. R., Luo, S., Onyia, J. E., and Hale, J. E. (2008). Ghrelin octanoylation mediated by an orphan lipid transferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 6320–6325.
- Hansen, J. B., Arkhammar, P. O., Bodvarsdottir, T. B., and Wahl, P. (2004). Inhibition of insulin secretion as a new drug target in the treatment of metabolic disorders. *Curr. Med. Chem.* 11, 1595–1615.
- Hansen, T. K., Dall, R., Hosoda, H., Kojima, M., Kangawa, K., Christiansen, J. S., and Jorgensen, J. O. (2002). Weight loss increases circulating levels of ghrelin in human obesity. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 56, 203–206.
- Hillman, J. B., Tong, J., and Tschöp, M. (2011). Ghrelin biology and its role in weight-related disorders. *Discov. Med.* 11, 521–528.
- Hosoda, H., Kojima, M., Matsuo, H., and Kangawa, K. (2000). Ghrelin and des-acyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 279, 909–913.
- Howard, A. D., Feighner, S. D., Cully, D. E., Arena, J. P., Liberato, P. A., Rosenblum, C. I., Hamelin, M., Hreniuk, D. L., Palyha, O. C., Anderson, J., Pares, P. S., Diaz, C., Chou, M., Liu, K. K., Mckee, K. K., Pong, S. S., Chaung, L. Y., Elbrecht, A., Dashkevich, M., Heavens, R., Rigny, M., Sirinathsinghji, D. J., Dean, D. C., Melillo, D. G., Patchett, A. A., Nargund, R., Griffin, P. R., Demartino, J. A., Gupta, S. K., Schaeffer, J. M., Smith, R. G., and Van Der Ploeg, L. H. (1996). A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science* 273, 974–977.
- Irako, T., Akamizu, T., Hosoda, H., Iwakura, H., Ariyasu, H., Tojo, K., Tajima, N., and Kangawa, K. (2006). Ghrelin prevents development of diabetes at adult age in streptozotocin-treated newborn rats. *Diabetologia* 49, 1264–1273.
- Isgaard, J., and Granata, R. (2011). Ghrelin in cardiovascular disease and atherogenesis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 340, 59–64.
- Jain, R., and Lammert, E. (2009). Cell-cell interactions in the endocrine pancreas. *Diabetes Obes. Metab.* 11 (Suppl. 4), 159–167.
- Janson, E. T., and Oberg, K. (1999). Somatostatin receptor ligands and their use in the treatment of endocrine disorders. *Curr. Pharm. Des.* 5, 693–705.
- Jawiarczyk, A., Bolanowski, M., Strycka, J., Bednarek-Tupikowska, G., Kaluzny, M., Kolodziejczyk, A., and Domsowski, P. (2012). Effective therapy of insulinoma by using long-acting somatostatin analogue. A case report and literature review. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 120, 68–72.
- Jeffery, P. L., McGuckin, M. A., and Linden, S. K. (2011). Endocrine impact of *Helicobacter pylori*: focus on ghrelin and ghrelin o-acyltransferase. *World J. Gastroenterol.* 17, 1249–1260.
- Kadoglou, N. P., Sailer, N., Kapelouzou, A., Lampropoulos, S., Vitta, I., Kostakis, A., and Liapis, C. D. (2012). Effects of atorvastatin on apelin, visfatin (nampt), ghrelin and early carotid atherosclerosis in patients with type 2 diabetes. *Acta Diabetol.* 49, 269–276.
- Kageyama, H., Funahashi, H., Hirayama, M., Takenoya, F., Kita,

- T., Kato, S., Sakurai, J., Lee, E. Y., Inoue, S., Date, Y., Nakazato, M., Kangawa, K., and Shioda, S. (2005). Morphological analysis of ghrelin and its receptor distribution in the rat pancreas. *Regul. Pept.* 126, 67–71.
- Kerem, M., Salman, B., Ozsoy, S., Pasaoglu, H., Bedirli, A., Hazirolu, R., and Yilmaz, T. U. (2009). Exogenous ghrelin enhances endocrine and exocrine regeneration in pancreatectomized rats. *J. Gastrointest. Surg.* 13, 775–783.
- Kiewiet, R. M., van Aken, M. O., van der Weerd, K., Uitterlinden, P., Themmen, A. P., Hofland, L. J., de Rijke, Y. B., Delhanty, P. J., Ghigo, E., Abribat, T., and van der Lely, A. J. (2009). Effects of acute administration of acylated and unacylated ghrelin on glucose and insulin concentrations in morbidly obese subjects without overt diabetes. *Eur. J. Endocrinol.* 161, 567–573.
- Kineman, R. D., Gahete, M. D., and Luque, R. M. (2007). Identification of a mouse ghrelin gene transcript that contains intron 2 and is regulated in the pituitary and hypothalamus in response to metabolic stress. *J. Mol. Endocrinol.* 38, 511–521.
- Kinoshita, Y., Fujii, H., Takeshita, A., Taguchi, M., Miyakawa, M., Oyama, K., Yamada, S., and Takeuchi, Y. (2011). Impaired glucose metabolism in Japanese patients with acromegaly is restored after successful pituitary surgery if pancreatic β -cell function is preserved. *Eur. J. Endocrinol.* 164, 467–473.
- Kirchner, H., Gutierrez, J. A., Solenberg, P. J., Pfluger, P. T., Czyzyk, T. A., Willency, J. A., Schurmann, A., Joost, H. G., Jandacek, R. J., Hale, J. E., Heiman, M. L., and Tschöp, M. H. (2009). GOAT links dietary lipids with the endocrine control of energy balance. *Nat. Med.* 15, 741–745.
- Kojima, M., Hosoda, H., Date, Y., Nakazato, M., Matsuo, H., and Kangawa, K. (1999). Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402, 656–660.
- Kojima, M., and Kangawa, K. (2005). Ghrelin: structure and function. *Physiol. Rev.* 85, 495–522.
- Korbonits, M., and Grossman, A. B. (2004). Ghrelin: update on a novel hormonal system. *Eur. J. Endocrinol.* 151(Suppl. 1), S67–S70.
- Kumar, R., Salehi, A., Rehfeld, J. E., Hoglund, P., Lindstrom, E., and Hakanson, R. (2010). Proghrelin peptides: desacyl ghrelin is a powerful inhibitor of acylated ghrelin, likely to impair physiological effects of acyl ghrelin but not of obestatin A study of pancreatic polypeptide secretion from mouse islets. *Regul. Pept.* 164, 65–70.
- Lear, P. V., Iglesias, M. J., Feijoo-Bandin, S., Rodriguez-Penas, D., Mosquera-Leal, A., Garcia-Rua, V., Gualillo, O., Ghe, C., Arnoletti, E., Muccioli, G., Dieguez, C., Gonzalez-Juanatey, J. R., and Lago, F. (2010). Des-acyl ghrelin has specific binding sites and different metabolic effects from ghrelin in cardiomyocytes. *Endocrinology* 151, 3286–3298.
- Liu, G., Fortin, J. P., Beinborn, M., and Kopin, A. S. (2007). Four missense mutations in the ghrelin receptor result in distinct pharmacological abnormalities. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 322, 1036–1043.
- Liu, J., Prudom, C. E., Nass, R., Pezzoli, S. S., Oliveri, M. C., Johnson, M. L., Veldhuis, P., Gordon, D. A., Howard, A. D., Witcher, D. R., Geyesen, H. M., Gaylinn, B. D., and Thorner, M. O. (2008). Novel ghrelin assays provide evidence for independent regulation of ghrelin acylation and secretion in healthy young men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93, 1980–1987.
- Liu, Y., Zhou, Y. B., Zhang, G. G., Cai, Y., Duan, X. H., Teng, X., Song, J. Q., Shi, Y., Tang, C. S., Yin, X. H., and Qi, Y. F. (2010). Cortistatin attenuates vascular calcification in rats. *Regul. Pept.* 159, 35–43.
- Longo, K. A., Charoentongtrakul, S., Giuliana, D. J., Govek, E. K., Mcdonagh, T., Qi, Y., Distefano, P. S., and Geddes, B. J. (2008). Improved insulin sensitivity and metabolic flexibility in ghrelin receptor knockout mice. *Regul. Pept.* 150, 55–61.
- Lustig, R. H., Greenway, F., Velasquez-Mieyer, P., Heimbürger, D., Schumacher, D., Smith, D., Smith, W., Soler, N., Warsi, G., Berg, W., Maloney, J., Benedetto, J., Zhu, W., and Hohnaker, J. (2006). A multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-finding trial of a long-acting formulation of octreotide in promoting weight loss in obese adults with insulin hypersecretion. *Int. J. Obes. (Lond.)* 30, 331–341.
- Maccario, M., Grotoli, S., Procopio, M., Oleandri, S. E., Rossetto, R., Gauna, C., Arvat, E., and Ghigo, E. (2000). The GH/IGF-I axis in obesity: influence of neuro-endocrine and metabolic factors. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 24(Suppl. 2), S96–S99.
- Mazziotti, G., Floriani, I., Bonadonna, S., Torri, V., Chanson, P., and Giustina, A. (2009). Effects of somatostatin analogs on glucose homeostasis: a metaanalysis of acromegaly studies. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94, 1500–1508.
- Mazziotti, G., Gazzaruso, C., and Giustina, A. (2011). Diabetes in Cushing syndrome: basic and clinical aspects. *Trends Endocrinol. Metab.* 22, 499–506.
- McLaughlin, T., Abbasi, F., Lamendola, C., Frayo, R. S., and Cummings, D. E. (2004). Plasma ghrelin concentrations are decreased in insulin-resistant obese adults relative to equally obese insulin-sensitive controls. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89, 1630–1635.
- Moller, L. N., Stidsen, C. E., Hartmann, B., and Holst, J. J. (2003). Somatostatin receptors. *Biochim. Biophys. Acta* 1616, 1–84.
- Mousseaux, D., Le Gallic, L., Ryan, J., Oiry, C., Gagne, D., Fehrentz, J. A., Galleyrand, J. C., and Martinez, J. (2006). Regulation of ERK1/2 activity by ghrelin-activated growth hormone secretagogue receptor 1A involves a PLC/PKCvarepsilon pathway. *Br. J. Pharmacol.* 148, 350–365.
- Muccioli, G., Baragli, A., Granata, R., Papotti, M., and Ghigo, E. (2007). Heterogeneity of ghrelin/growth hormone secretagogue receptors. Toward the understanding of the molecular identity of novel ghrelin/GHS receptors. *Neuroendocrinology* 86, 147–164.
- Nothacker, H. P., Wang, Z., Zeng, H., Mahata, S. K., O'Connor, D. T., and Civelli, O. (2005). Proadrenomedullin N-terminal peptide and cortistatin activation of Mrx2 receptor is based on a common structural motif. *Eur. J. Pharmacol.* 519, 191–193.
- Pantel, J., Legendre, M., Cabrol, S., Hilal, L., Hajaji, Y., Morisset, S., Nivot, S., Vie-Luton, M. P., Grouselle, D., De Kerdanet, M., Kadiri, A., Epelbaum, J., Le Bouc, Y., and Amselem, S. (2006). Loss of constitutive activity of the growth hormone secretagogue receptor in familial short stature. *J. Clin. Invest.* 116, 760–768.
- Papotti, M., Tarabra, E., Allia, E., Bozzalla-Cassione, F., Broglio, F., Deghenghi, R., Ghigo, E., and Muccioli, G. (2003). Presence of cortistatin in the human pancreas. *J. Endocrinol. Invest.* 26, RC15–RC18.
- Patel, Y. C. (1999). Somatostatin and its receptor family. *Front. Neuroendocrinol.* 20, 157–198.
- Petersenn, S., Schopohl, J., Barkan, A., Mohideen, P., Colao, A., Abs, R., Buchelt, A., Ho, Y. Y., Hu, K., Farrall, A. J., Melmed, S., and Biller, B. M. (2010). Pasireotide (SOM230) demonstrates efficacy and safety in patients with acromegaly: a randomized, multicenter, phase II trial. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 95, 2781–2789.
- Poykko, S. M., Kellokoski, E., Horkko, S., Kauma, H., Kesaniemi, Y. A., and Ukkola, O. (2003). Low plasma ghrelin is associated with insulin resistance, hypertension, and the prevalence of type 2 diabetes. *Diabetes* 52, 2546–2553.
- Prado, C. L., Pugh-Bernard, A. E., Elghazi, L., Sosa-Pineda, B., and Susse, L. (2004). Ghrelin cells replace insulin-producing beta cells in two mouse models of pancreas development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 2924–2929.
- Qader, S. S., Hakanson, R., Rehfeld, J. E., Lundquist, I., and Salehi, A. (2008). Proghrelin-derived peptides influence the secretion of insulin, glucagon, pancreatic polypeptide and somatostatin: a study on isolated islets from mouse and rat pancreas. *Regul. Pept.* 146, 230–237.
- Qader, S. S., Lundquist, I., Ekelund, M., Hakanson, R., and Salehi, A. (2005). Ghrelin activates neuronal constitutive nitric oxide synthase in pancreatic islet cells while inhibiting insulin release and stimulating glucagon release. *Regul. Pept.* 128, 51–56.
- Qi, Y., Longo, K. A., Giuliana, D. J., Gagne, S., Mcdonagh, T., Govek, E., Nolan, A., Zou, C., Morgan, K., Hixon, J., Saunders, J. O., Distefano, P. S., and Geddes, B. J. (2011). Characterization of the insulin sensitivity of ghrelin receptor KO mice using glycemic clamps. *BMC Physiol.* 11, 1. doi: 10.1186/1472-6793-11-1
- Regard, J. B., Sato, I. T., and Coughlin, S. R. (2008). Anatomical profiling of G protein-coupled receptor expression. *Cell* 135, 561–571.
- Reinehr, T., De Sousa, G., and Roth, C. L. (2008). Obestatin and ghrelin levels in obese children and adolescents before and after reduction of overweight. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 68, 304–310.
- Ren, A. J., Guo, Z. F., Wang, Y. K., Lin, L., Zheng, X., and Yuan, W. J. (2009). Obestatin, obesity and diabetes. *Peptides* 30, 439–444.
- Resmini, E., Minuto, F., Colao, A., and Ferone, D. (2009). Secondary diabetes associated with principal endocrinopathies: the impact of new treatment modalities. *Acta Diabetol.* 46, 85–95.

- Saad, M. F., Bernaba, B., Hwu, C. M., Jinagouda, S., Fahmi, S., Kogosov, E., and Boyadjian, R. (2002). Insulin regulates plasma ghrelin concentration. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, 3997–4000.
- Sahin, I., Aydin, S., Ozkan, Y., Dagli, A. F., Akin, K. O., Guzel, S. P., Catak, Z., and Ozercan, M. R. (2011). Diet-induced obesity suppresses ghrelin in rat gastrointestinal tract and serum. *Mol. Cell. Biochem.* 355, 299–308.
- Sakata, I., Yang, J., Lee, C. E., Osborne-Lawrence, S., Rovinsky, S. A., Elmquist, J. K., and Zigman, J. M. (2009). Colocalization of ghrelin O-acyltransferase and ghrelin in gastric mucosal cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 297, E134–E141.
- Saltiel, A. R., and Kahn, C. R. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414, 799–806.
- Sato, T., Nakamura, Y., Shiimura, Y., Ohgusu, H., Kangawa, K., and Kojima, M. (2012). Structure, regulation and function of ghrelin. *J. Biochem.* 151, 119–128.
- Schellekens, H., Dinan, T. G., and Cryan, J. F. (2010). Lean mean fat reducing “ghrelin” machine: hypothalamic ghrelin and ghrelin receptors as therapeutic targets in obesity. *Neuropharmacology* 58, 2–16.
- Seim, I., Amorim, L., Walpole, C., Carter, S., Chopin, L. K., and Herington, A. C. (2010). Ghrelin gene-related peptides: multi-functional endocrine/autocrine modulators in health and disease. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 37, 125–131.
- Seim, I., Collet, C., Herington, A. C., and Chopin, L. K. (2007). Revised genomic structure of the human ghrelin gene and identification of novel exons, alternative splice variants and natural antisense transcripts. *BMC Genomics* 8, 298. doi: 10.1186/1471-2164-8-298
- Shenouda, M., Maldonado, M., Wang, Y., Bouillaud, E., Hudson, M., Nesheiwat, D., and Hu, K. (2012). An open-label dose-escalation study of once-daily and twice-daily pasireotide in healthy volunteers: safety, tolerability, and effects on glucose, insulin, and glucagon levels. *Am. J. Ther.* doi: 10.1097/MJT.0b013e31824c3eb4 [Epub ahead of print].
- Solomon, T. P., Chambers, E. S., Jeukendrup, A. E., Toogood, A. A., and Blannin, A. K. (2008). The effect of feeding frequency on insulin and ghrelin responses in human subjects. *Br. J. Nutr.* 100, 810–819.
- Souza-Moreira, L., Campos-Salinas, J., Caro, M., and Gonzalez-Rey, E. (2011). Neuropeptides as pleiotropic modulators of the immune response. *Neuroendocrinology* 94, 89–100.
- Strowski, M. Z., and Blake, A. D. (2008). Function and expression of somatostatin receptors of the endocrine pancreas. *Mol. Cell. Endocrinol.* 286, 169–179.
- Sun, Y., Garcia, J. M., Saha, P. K., Chan, L., and Smith, R. G. (2006). Ablation of ghrelin improves the diabetic but not obese phenotype of ob/ob mice. *Cell Metab.* 3, 379–386.
- Sun, Y., Garcia, J. M., and Smith, R. G. (2007). Ghrelin and growth hormone secretagogue receptor expression in mice during aging. *Endocrinology* 148, 1323–1329.
- Togliatto, G., Trombetta, A., Dentelli, P., Baragli, A., Rosso, A., Granata, R., Ghigo, D., Pegoraro, L., Ghigo, E., and Brizzi, M. F. (2010). Unacylated ghrelin rescues endothelial progenitor cell function in individuals with type 2 diabetes. *Diabetes* 59, 1016–1025.
- Tong, J., Prigeon, R. L., Davis, H. W., Bidlingmaier, M., Kahn, S. E., Cummings, D. E., Tschop, M. H., and D’Alessio, D. (2010). Ghrelin suppresses glucose-stimulated insulin secretion and deteriorates glucose tolerance in healthy humans. *Diabetes* 59, 2145–2151.
- Toshinai, K., Yamaguchi, H., Sun, Y., Smith, R. G., Yamanaka, A., Sakurai, T., Date, Y., Mondal, M. S., Shimbara, T., Kawagoe, T., Murakami, N., Miyazato, M., Kangawa, K., and Nakazato, M. (2006). Des-acyl ghrelin induces food intake by a mechanism independent of the growth hormone secretagogue receptor. *Endocrinology* 147, 2306–2314.
- Tostivint, H., Lihrmann, I., Bucharles, C., Vieau, D., Coulouarn, Y., Fournier, A., Conlon, J. M., and Vaudry, H. (1996). Occurrence of two somatostatin variants in the frog brain: characterization of the cDNAs, distribution of the mRNAs, and receptor-binding affinities of the peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 12605–12610.
- Tschop, M., Smiley, D. L., and Heiman, M. L. (2000). Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 407, 908–913.
- Tschop, M., Weyer, C., Tataranni, P. A., Devanarayan, V., Ravussin, E., and Heiman, M. L. (2001). Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes* 50, 707–709.
- Tzotzas, T., Papazisis, K., Perros, P., and Krassas, G. E. (2008). Use of somatostatin analogues in obesity. *Drugs* 68, 1963–1973.
- Ueberberg, B., Unger, N., Saeger, W., Mann, K., and Petersenn, S. (2009). Expression of ghrelin and its receptor in human tissues. *Horm. Metab. Res.* 41, 814–821.
- Ukkola, O. (2011). Genetic variants of ghrelin in metabolic disorders. *Pepptides* 32, 2319–2322.
- van der Hoek, J., van der Lelij, A. J., Feelders, R. A., De Herder, W. W., Uitterlinden, P., Poon, K. W., Boerlin, V., Lewis, I., Krahnke, T., Hofland, L. J., and Lamberts, S. W. (2005). The somatostatin analogue SOM230, compared with octreotide, induces differential effects in several metabolic pathways in acromegalic patients. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 63, 176–184.
- van der Lely, A. J., Tschop, M., Heiman, M. L., and Ghigo, E. (2004). Biological, physiological, pathophysiological, and pharmacological aspects of ghrelin. *Endocr. Rev.* 25, 426–457.
- Velasquez-Mieryer, P. A., Umpierrez, G. E., Lustig, R. H., Cashion, A. K., Cowan, P. A., Christensen, M., Spencer, K. A., and Burghen, G. A. (2004). Race affects insulin and GLP-1 secretion and response to a long-acting somatostatin analogue in obese adults. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 28, 330–333.
- Veldhuis, J. D., and Bowers, C. Y. (2010). Integrating GHS into the Ghrelin System. *Int. J. Pept.* 2010, 879503.
- Venables, M. C., and Jeukendrup, A. E. (2009). Physical inactivity and obesity: links with insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 25(Suppl. 1), S18–S23.
- Verhulst, P. J., and Depoortere, I. (2012). Ghrelin’s second life: from appetite stimulator to glucose regulator. *World J. Gastroenterol.* 18, 3183–3195.
- Vestergaard, E. T., Gormsen, L. C., Jessen, N., Lund, S., Hansen, T. K., Moller, N., and Jorgensen, J. O. (2008). Ghrelin infusion in humans induces acute insulin resistance and lipolysis independent of growth hormone signaling. *Diabetes* 57, 3205–3210.
- Volante, M., Allia, E., Gugliotta, P., Funaro, A., Broglio, F., Deghenghi, R., Muccioli, G., Ghigo, E., and Papotti, M. (2002). Expression of ghrelin and of the GH secretagogue receptor by pancreatic islet cells and related endocrine tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, 1300–1308.
- Wierup, N., Svensson, H., Mulder, H., and Sundler, F. (2002). The ghrelin cell: a novel developmentally regulated islet cell in the human pancreas. *Regul. Pept.* 107, 63–69.
- Wierup, N., Yang, S., Mceville, R. J., Mulder, H., and Sundler, F. (2004). Ghrelin is expressed in a novel endocrine cell type in developing rat islets and inhibits insulin secretion from INS-1 (832/13) cells. *J. Histochem. Cytochem.* 52, 301–310.
- Wortley, K. E., Del Rincon, J. P., Murray, J. D., Garcia, K., Iida, K., Thorne, M. O., and Sleeman, M. W. (2005). Absence of ghrelin protects against early-onset obesity. *J. Clin. Invest.* 115, 3573–3578.
- Wren, A. M., Small, C. J., Abbott, C. R., Dhillon, W. S., Seal, L. J., Cohen, M. A., Batterham, R. L., Taheri, S., Stanley, S. A., Ghatei, M. A., and Bloom, S. R. (2001). Ghrelin causes hyperphagia and obesity in rats. *Diabetes* 50, 2540–2547.
- Wren, A. M., Small, C. J., Ward, H. L., Murphy, K. G., Dakin, C. L., Taheri, S., Kennedy, A. R., Roberts, G. H., Morgan, D. G., Ghatei, M. A., and Bloom, S. R. (2000). The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology* 141, 4325–4328.
- Yang, J., Zhao, T. J., Goldstein, J. L., and Brown, M. S. (2008). Inhibition of ghrelin O-acyltransferase (GOAT) by octanoylated pentapeptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 10750–10755.
- Yoshimoto, A., Mori, K., Sugawara, A., Mukoyama, M., Yahata, K., Suganami, T., Takaya, K., Hosoda, H., Kojima, M., Kangawa, K., and Nakao, K. (2002). Plasma ghrelin and desacyl ghrelin concentrations in renal failure. *J. Am. Soc. Nephrol.* 13, 2748–2752.
- Zhu, X., Cao, Y., Voogd, K., and Steiner, D. F. (2006). On the processing of proghrelin to ghrelin. *J. Biol. Chem.* 281, 38867–38870.
- Zigman, J. M., Nakano, Y., Coppari, R., Balthasar, N., Marcus, J. N., Lee, C. E., Jones, J. E., Deysher, A. E., Waxman, A. R., White, R. D., Williams, T. D., Lachey, J. L., Seeley, R. J., Lowell, B. B., and Elmquist, J. K. (2005). Mice lacking ghrelin receptors resist the development of diet-induced obesity. *J. Clin. Invest.* 115, 3564–3572.

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 10 May 2012; accepted: 03 September 2012; published online: 18 September 2012.

Citation: Chanclón B, Martínez-Fuentes AJ and Gracia-Navarro F (2012) Role of

SST, CORT, and ghrelin and its receptors at the endocrine pancreas. *Front. Endocrin.* 3:114. doi: 10.3389/fendo.2012.00114

This article was submitted to *Frontiers in Systems and Translational*

Endocrinology, a specialty of *Frontiers in Endocrinology*.

Copyright © 2012 Chanclón, Martínez-Fuentes and Gracia-Navarro. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons

Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in other forums, provided the original authors and source are credited and subject to any copyright notices concerning any third-party graphics etc.

REGULATION OF SST/CORT AND GHRELIN SYSTEMS AT THE MOUSE PANCREAS BY DIFFERENT METABOLIC CONDITIONS

B. Chanción¹, R.M. Luque¹, J. Córdoba-Chacón¹, A.I. Pozo-Salas¹,
L. de Lecea², J.P. Castaño¹, F. Gracia-Navarro¹, A.J. Martínez-Fuentes¹

1. *Dpt. Cell Biology, Physiology, and Immunology. Univ. de Córdoba. Hospital Univ. Reina Sofía. Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC). CIBEROBn. Córdoba. Spain.* 2. *Dpt. Psychiatry and Behavioral Sciences, Stanford Univ. School of Medicine, Palo Alto, CA. USA.*

Somatostatin was originally discovered as a 14-residue peptide encoded by the SST gene, a highly conserved gene among vertebrates. During early vertebrate evolution, it has been proposed that the ancestral SST gene underwent duplication events, which originated at least 4 different genes, including cortistatin (CORT) gene. The mature CORT peptides shares high sequence identity and structural homology with SST-14, which explains that both peptides exhibit similar binding affinity for the widely distributed SST receptor subtypes (sst1-5), and also support their similar actions, such as their inhibitory effects on exocrine and endocrine secretions. Intriguingly, it has been described that CORT, but not SST, is able to displace ghrelin, an apparently unrelated neuropeptide exhibiting divergent functions, from its specific receptor, GHS-R. This intricate interrelationship between SST/CORT and ghrelin systems may be essential in the control of metabolic homeostasis, since, for example, insulin release is inhibited by SST/CORT and stimulated by ghrelin. To better understand the underlying mechanism involved in this insulin regulation, we analyzed the expression of such systems at the pancreatic level in wild type (WT) and CORT knock-out mice (CORT-KO) under both normal, low fat (LF) and high fat (HF; obese) diets by analyzing the mRNA levels of the distinct components of these systems by quantitative RT-PCR. Our data reveal that CORT expression was not detected in the pancreas of WT mice while the expression of SST, ghrelin and their receptors was variable. Thus, SST levels remain unaltered under the different conditions examined, whereas ghrelin levels increased exclusively in WT obese mice. Conversely, in CORT-KO obese mice, expression levels of ghrelin system components were markedly reduced as compared to WT mice. Finally, blood insulin levels were significantly lower in CORT-KO than those of WT animals. Taken together, our findings suggest that endogenous CORT is an important modulator of pancreatic function.

Introduction

SST is a 14-aa peptide member of a family of related proteins which were originated at early vertebrate evolution (1). The ancestral SST gene underwent two duplications events that originated 4 different genes (2). Thus, in addition to the originally identified SST gene, a second SST-related gene was identified in lower vertebrates and was named SS2 and in mammals where it was termed cortistatin (CORT) (1). CORT gene encodes a peptide of the same name that shares a remarkable sequence identity (11-aa) and structural homology with SST, including the FWKT motif that is essential for its biological activity, as well as the two cysteine residues responsible for their conserved

cyclic structure (3). SST is widely distributed in different organs and tissues, such as the pancreas, and elicits many different actions as inhibition of endocrine secretions and regulation of pancreatic function (4). SST exerts its diverse functions through coupling to a family of G protein-coupled receptor, named somatostatin receptors 1 to 5 (sst1-5), which may be simultaneously present and functionally interacting within the same cell (5). These receptors can also bind, with similar affinity and efficiency, to CORT, thus explaining the close pharmacology between SST and CORT (6). Additionally, CORT but not SST is also able to bind to MrgX2 (7), a rather promiscuous orphan GPCR, as well as to the ghrelin receptor (GH secretagogue receptor, GHS-R), which is also widely distributed (8). Binding of CORT to GHS-R commonly exerts opposite biological actions to those elicited through binding to sst1-5 (6).

On the other hand, ghrelin is a 28 amino acid peptide originally isolated from the stomach of humans and rats based on its potent GH releasing activity through coupling to GHS-R. Ghrelin is the first natural hormone to be identified in which its third residue of the chain, serine, exhibits the modification of an n-octanoyl group (9), a middle-chain fatty acid which is essential for its biological activity. This unusual post-translational modification is catalyzed by the ghrelin O-acyltransferase (GOAT) (10).

In summary, SST/CORT and ghrelin are closely related pleiotropic systems that share tissue targets, as the pancreas, in which SST and ghrelin producing cells, delta and epsilon cells respectively, are in a direct and close interaction with insulin and glucagon producing cells at the Langerhans islets. In this pancreatic scenario, the close interrelationship between SST/CORT and ghrelin systems may be essential in the control of metabolic homeostasis, for example, in the case of insulin secretion, which is inhibited by SST and CORT (11) and stimulated by Ghrelin (12). In this context and in order to better understand the underlying mechanism involved in insulin regulation, we have studied the expression of the components of SST/CORT and ghrelin systems in normal and extreme metabolic conditions, like diet-induced obesity.

Materials and Methods

In this study C57Bl/6J mice were used and all experiments procedures were performed according to the regulations of the Animal Care and Use Committees of the University of Cordoba, Spain. A colony of CORT-KO animals, initially generated by Dr. de Lecea, was established by crossing WT and CORT-KO mice. Animals were housed at the University facilities under standard conditions of light (12:12-h light-dark cycle) and temperature (22–24°C), with free access to water and food (*ad libitum*).

For the experiments in which the effect of metabolic conditions was evaluated, WT and CORT-KO animals were assigned to one of the following groups: standard rodent chow (fat, 17 kcal%; carbohydrate, 56 kcal%; protein, 27 kcal%; Lab-Diet, St. Louis), low-fat diet (LF; fat, 10 kcal%; carbohydrate, 70 kcal%; protein, 20 kcal%) or high-fat diet (HF; fat, 60 kcal%; carbohydrate, 20 kcal%; protein, 20 kcal%). LF- and HF diets, as palatable pellets (Research Diets, Brunswick, NJ) were supplied to 5 weeks old mice and maintained during 5 months. After that animals were sacrificed and pancreas obtained. Tissue samples were immediately submerged into Trizol Reagent and total RNA isolated by following manufacturer's instructions. For pancreatic islets isolation a modification of the method developed by Li et al. (13) was used and its RNA was extracted by using the Absolutely RNA Miniprep Kit (Stratagene).

Finally, RNA was reverse transcribed and the expression of the different components of SST/CORT and Ghrelin system, as well as their receptors, analyzed by quantitative RT-PCR.

Results and Discussion

1. SST/CORT system. Our data reveals that CORT expression was undetectable at the pancreas of WT mice, while the expression of SST and its receptors remain unaltered at the pancreas of CORT-KO animals compared to WT counterparts. Moreover, such levels remained also unchanged at the pancreas of both WT and animals lacking the expression of CORT under obesity conditions induced by HFD. The fact that in the absence of CORT, SST and its receptor expression remain unchanged indicated that there is not a compensatory mechanism at the pancreatic level for this two well-related peptides. Moreover, these data contribute to support the notion that SST and CORT might play dissimilar functions at the endocrine pancreas as it has been previously reported in other endocrine tissues (3).

2. Ghrelin system. In our experimental settings, Ghrelin peptide maintained the same level of expression in the pancreas of WT and CORT-KO; however the expression of GOAT, enzyme responsible of the activation of ghrelin, and GHS-R was significantly reduced in the pancreas of animals lacking CORT expression. Furthermore, under obesity conditions induced by diet, ghrelin levels significantly increased in the endocrine pancreas of WT mice in a similar manner to that previously reported about the stomach (14). However, in CORT-KO animals, such increase in obesity induced-ghrelin levels was not observed. In clear contrast to that observed for ghrelin in WT mice, GOAT transcript levels were not affected by a HFD, while they were reduced in the pancreas of CORT-KO mice. In the case of GHS-R, its expression was increased in pancreas of WT animals under a HFD, similarly to that observed for ghrelin, while no variation in neither GOAT nor GHS-R was observed in the pancreas of CORT-KO mice.

3. Insulin. The inhibitory effect of SST/CORT and the stimulatory effect of Ghrelin on insulin secretion have been described previously. However the role of CORT in pancreas has not been extensively studied yet. Our results revealed that insulin mRNA expression was significantly reduced in the pancreas of CORT deficient animals and, consequently, a reduction in circulating insulin levels was also observed.

It is well known that under obesity conditions, insulin levels are higher than in normal conditions. In our experimental setting, we observed a significant increase in both insulin1 and insulin2 mRNA levels at the pancreas of obese WT mice. However such increase was not observed in the pancreas of CORT-KO under the same metabolic conditions, suggesting that CORT play a role in mediating the effects of obesity on insulin.

In sum, whereas ghrelin levels increased exclusively in WT obese mice, SST expression remains unaltered. However, in CORT-KO obese mice, expression levels of ghrelin system components were significantly reduced as compared to WT mice, indicating that both systems might play a relevant role in the endocrine pancreas under normal and severe metabolic conditions (obesity). Finally, blood insulin levels were significantly lower in CORT-KO than those of WT animals suggesting that endogenous CORT is an important modulator of pancreatic function.

Acknowledgements

This work was supported in part by: Programa Ramon y Cajal RYC-2007-00186 and BFU2010-19300 (Ministerio de Ciencia e Innovación), BIO-139, and CTS-5051 (Junta de Andalucía); grants from NIH, and CIBERObn.

References

1. Tostivint H, Joly L, Lihmann I, Parmentier C, Lebon A, Morisson M, Calas A, Ekker M, Vaudry H 2006 Comparative genomics provides evidence for close evolutionary relationships between the urotensin II and somatostatin gene families. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:2237-2242.
2. Larhammar D, Sundström G, Dreborg S, Daza DO, Larsson TA 2009 Major genomic events and their consequences for vertebrate evolution and endocrinology. *Ann N Y Acad Sci* 1163:201-208.
3. Gahete MD, Durán-Prado M, Luque RM, Martínez-Fuentes AJ, Vázquez-Martínez R, Malagón MM, Castaño JP 2008 Are somatostatin and cortistatin two siblings in regulating endocrine secretions? In vitro work ahead. *Mol Cell Endocrinol* 286:128-134.
4. Patel YC 1999 Somatostatin and its receptor family. *Front Neuroendocrinol* 20:157-198.
5. Moller LN, Stidsen CE, Hartmann B, Holst JJ 2003 Somatostatin receptors. *Biochim Biophys Acta* 1616:1-84
6. De Lecea L, Castaño JP 2006 Cortistatin: not just another somatostatin analog. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2:356-357.
7. Robas N, Mead E, Fidock M 2003 MrgX2 is a high potency cortistatin receptor expressed in dorsal root ganglion. *J Biol Chem* 278:44400-44404.
8. Deghenghi R, Papotti M, Ghigo E, Muccioli G 2001 Cortistatin, but not somatostatin, binds to growth hormone secretagogue (GHS) receptors of human pituitary gland. *J Endocrinol Invest* 24:RC1-3.
9. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K 1999 Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402:656-660.
10. Yang J, Brown MS, Liang G, Grishin NV, Goldstein JL 2008 Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone. *Cell* 132:387-396.
11. Grottoli S, Gasco V, Broglio F, Baldelli R, Ragazzoni F, Gallenca F, Mainolfi A 2006 Cortistatin-17 and somatostatin-14 display the same effects on growth hormone, prolactin, and insulin secretion in patients with acromegaly or prolactinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 91:1595-1599.
12. Date Y, Nakazato M, Hashiguchi S, Dezaki K, Mondal MS, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Arima T, Matsuo H, Yada T, Matsukura S 2002 Ghrelin is present in pancreatic alpha-cells of humans and rats and stimulates insulin secretion. *Diabetes* 51:124-129.
13. Li DS, Yuan YH, Tu HJ, Liang QL, Dai LJ 2009 A protocol for islet isolation from mouse pancreas. *Nat Protoc* 4:1649-1652.
14. Morash MG, Gagnon J, Nelson S, Anini Y 2010 Tissue distribution and effects of fasting and obesity on the ghrelin axis in mice. *Regul Peptides* 163:62-73.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28

Role of endogenous cortistatin in the regulation of ghrelin system expression at pancreatic level under normal and obese conditions.

Belén Chanclón, José Córdoba-Chacón, Manuel D. Gahete, Ana I Pozo-Salas, Justo P. Castaño, Francisco Gracia-Navarro #, Antonio J. Martínez-Fuentes #,*

Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, University of Cordoba and Reina Sofia University Hospital, Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC), and CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición, Córdoba, Spain.

Running head: CORT effect on pancreatic endocrine function

#These two authors equally contributed in the direction of this work.

***Corresponding author at:** Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Campus Universitario de Rabanales, Edificio Severo-Ochoa (C-6), Planta 3, University of Cordoba, 14014 Córdoba, Spain.

e-mail: bc2mafua@uco.es (Antonio J. Martinez-Fuentes)

Phone: +34 957 218594

Fax: +34 957 218634

Conflict of Interest Statement: The authors disclose no personal or financial conflicts of interest.

1 Author's Contributions

2

3 Conceived and designed the experiments: BC, RML, JC-C, MDG, JPC, FGN, AJMF.

4 Performed the experiments: BC, RML, JC-C, AIP-S, MDG, AJMF.

5 Analyzed the data: BC, RML, JPC, FGN, AJMF

6 Contributed reagents/materials/analysis tools: BC, JC-C, RML, JPC.

7 Wrote the paper: BC, JC-C, RML, JPC, FGN, AJMF.

8

9

1 **Abstract**

2

3 Ghrelin-system components [native ghrelin, In1-ghrelin, Ghrelin-O-acyltransferase
4 enzyme (GOAT) and receptors (GHS-Rs)] are expressed in a wide variety of tissues,
5 including the pancreas, where they exert different biological actions including regulation
6 of neuroendocrine secretions, food intake and pancreatic function. Cortistatin (CORT),
7 a neuropeptide able to activate GHS-R, has emerged as an additional link in gut-brain
8 interplay, wherein ghrelin-system has also been described to be regulated by metabolic
9 conditions and to be associated with the progression of obesity and insulin resistance.
10 In this context, we recently reported that male CORT deficient mice (cort^{-/-}) are insulin-
11 resistant and present a clear dys-regulation in the stomach ghrelin-system. The present
12 work was focused at analyzing the expression pattern of ghrelin-system components at
13 the endocrine pancreas of cort^{-/-} mice and their control littermates (cort^{+/+}) under low-
14 or high-fat diet. Our data reveal that ghrelin-system components are expressed at the
15 mouse pancreatic level; however their relative expression levels varie. Thus, whereas
16 native ghrelin, In1-ghrelin and GHS-R expression levels were not altered in cort^{-/-}
17 compared with controls, GOAT mRNA levels were significantly lower in cort^{-/-} mice.
18 Interestingly, In1-ghrelin was expressed at higher levels than native-ghrelin. Moreover,
19 a significant increase in pancreatic expression of native-ghrelin, In1-ghrelin and GHS-R
20 was observed in obese cort^{+/+} but not in cort^{-/-} mice. Interestingly, insulin expression
21 and release was elevated in obese cort^{+/+}, however, these changes were not
22 observed in cort^{-/-} mice. Altogether, our results indicate that the ghrelin-system is
23 clearly regulated at the pancreas of cort^{+/+} and cort^{-/-} under normal and/or obesity
24 conditions suggesting that this system may play relevant roles in the endocrine
25 pancreas. Most importantly, our data demonstrate, for the first time, that endogenous
26 CORT is essential for the obesity-induced changes in insulin expression/secretion
27 observed in mice, suggesting that CORT is a key regulatory component of the
28 pancreatic function.

29

30 **Keywords:** ghrelin, In1-ghrelin, GHS-R, insulin, cortistatin (CORT), islet.

31

1 **Introduction.**

2 Ghrelin gene (GHRL) is a complex gene whose regulation generates, either through
3 alternative splicing or post-translational modifications, a wide variety of transcripts and
4 proteins with multiple functions [1,2,3,4]. Particularly, the well-known native/acylated-
5 ghrelin (henceforth referred to as ghrelin) and the In1-ghrelin variant, which retains the
6 GHRL intron-1 sequence [5,6], are regulated in a tissue-dependent manner by
7 metabolic status and display patho-physiological relevance at different levels [5,6].
8 Ghrelin is a 28-amino acid multifunctional hormone predominantly produced by the
9 stomach, but also lower amounts are generated in wide variety of tissues including the
10 pancreas, where it can act as a paracrine/autocrine factor [7,8,9,10,11]. Ghrelin
11 displays the unique distinctive feature to be acylated at its third residue (Ser) by the
12 ghrelin O-acyltransferase (GOAT) enzyme, which endows ghrelin as the natural ligand
13 of the ghrelin receptor [formerly known as growth hormone (GH) secretagogue receptor
14 (GHSR)] [12,13,14]. Although the endogenous receptor for In1-ghrelin peptide is still
15 unknown, this novel variant is also susceptible to be acylated since it shares the same
16 start codon, the signal peptide and the first 12aa of ghrelin, which includes the putative
17 acylation site at Ser3 and the residues found to be necessary for acylation (Gly1 and
18 Phe4) [6].

19 Although it has been documented that ghrelin-derived peptides/GOAT/GHSR comprise
20 an important regulatory system for the modulation of pancreatic function, questions
21 remain unanswered regarding the mechanism(s) by which the ghrelin-system is locally
22 produced and regulated under normal and obese conditions. In line with this, our group
23 and others have suggested the existence of a unique functional interaction between the
24 ghrelin-system and cortistatin (CORT), a peptide that shares high structural and
25 functional similarities with somatostatin (SST). Specifically, it has been reported that
26 CORT, but not SST, binds with high affinity to the GHSR, and that some endocrine
27 actions of CORT are mediated through the GHSR [15,16]. Moreover, we have recently
28 reported that endogenous CORT is substantially involved in the control of
29 insulin/glucose homeostasis and these actions might be influenced by the level of
30 circulating ghrelin [16]. Based on these observations, the study of the plausible
31 involvement of CORT in the regulation of the different components of the ghrelin-
32 system could shed new light in the complex relationship between these regulatory
33 systems (CORT/ghrelin) in pancreatic function under normal and pathological states.
34 To this end, in the present work we sought to investigate, for the first time, the
35 expression and regulation of the ghrelin–system (native-ghrelin, In1-ghrelin, GHSR and

1 GOAT) as well as of insulin levels in the pancreas of cort+/- and CORT-deficient mice
2 under basal and obese conditions.

4 **Materials and methods**

5 **Ethics Statement**

7 All experimental procedures for animal care and experimentation were approved by the
8 Ethical Committee of the Cordoba University.

10 **Animals.**

12 C57Bl/6J male and female wild-type mice (cort +/+) were purchased from Charles
13 River (Barcelona, Spain) and CORT knockout mice (cort -/-) were generated from an
14 in-house breeding colony [16]. Genotypes were determined by conventional PCR from
15 snipped tails as previously described [16]. All animals were housed under standard
16 conditions of light cycle (12h light: 12h dark), temperature (22-24°C), with standard
17 food (SAFE-diets; Barcelona, Spain) and water *ad libitum* until the experimental diet-
18 induced obesity was performed (see below). Males of the colony were handled every
19 day for 2 weeks (wk), to become adapted, before the sacrifice.

21 **Experimental design and diet-induced obesity (DIO).**

23 At 4 wk of age, male mice were single-housed and fed with low-fat diet (LFD: 10 kcal%
24 from fat, 70 kcal% from carbohydrates and 20 kcal% from proteins) or under a high-fat
25 diet (HFD: 60 kcal% from fat, 20 kcal% from carbohydrates, 20 kcal% from proteins)
26 (Research Diets, Gentofte, Denmark) for 16 wk [17].

28 **Samples.**

30 At the end of the experiment, animals were sacrificed, all efforts were made to
31 minimize suffering, and the pancreas immediately removed and processed for either
32 islet isolation (see below) or RNA isolation. For RNA isolation, whole pancreas was
33 immersed in Trizol reagent, homogenized by a basic ultra-turrax (IKA, Staufen,

1 Germany), snap-frozen in liquid nitrogen and subsequently stored at -80°C until their
2 analysis as described below.

3 4 **Islet isolation and culture.**

5
6 For islet isolation, whole pancreas was placed in ice-cold collagenase V solution (1
7 mg/ml) and minced into small pieces. Then, tissue was maintained in a collagenase
8 solution at 37°C for 30-45 min period in water-bath, and every 10 min pancreatic pieces
9 were mixed by smooth pipetting. After that, pancreatic pieces were treated with DNase
10 for 10 min at 37 °C and washed 3 times with Hank's solution by 800 rpm centrifugation
11 at 4 °C for 30 s. Finally, islets were poured onto a 70 µm cell strainer in order to purify
12 them and cultured in complete RPMI 1640 medium as elsewhere described [18].
13 Finally, total RNA was isolated from cultured islets.

14 15 **RNA isolation and reverse transcription (RT).**

16
17 Total RNA was isolated according to Trizol reagent manufacturer's instructions
18 (Invitrogen, Barcelona, Spain) and treated with DNase kit (Promega, Madrid, Spain).
19 For RNA isolation from pancreatic islets, Absolutely RNA RT-PCR Miniprep Kit
20 Deoxyribonuclease treatment (Stratagene, La Jolla (CA), USA) was used by following
21 manufacturer's instructions. In both cases, total RNA was quantified by nanodrop and
22 afterward 2µg of total RNA was reverse transcribed by the RevertAid First Strand
23 cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Hanover, USA).

24 25 **Quantitative real-time PCR.**

26
27 PCR conditions, primer design and validation, as well as PCR transcript quantification
28 was performed as previously described [16,17,19]. Expected mRNA pancreatic
29 transcripts were normalized by a normalization factor obtained from the quantification
30 of 3 different housekeeping genes [Cyclophilin-A, β-actin and glyceraldehyde-3-
31 phosphate-dehydrogenase (GAPDH)] and generated by the GeNorm 3.3 software [20].
32 Due to the limited amount of pancreatic islet sample obtained, transcript normalization
33 was performed by adjusting copy number of each transcript by the copy number of β-
34 actin.

35 36 **Assessment of plasma insulin**

1 Trunk blood was collected from cort +/+ and -/- mice, immediately mixed with
2 MiniProtease inhibitor (Roche; Barcelona, Spain), placed on ice, centrifuged and
3 plasma was stored at -80C until insulin determination. Circulating insulin level was
4 assessed by using a commercial ELISA kit (Millipore; Madrid, Spain).

5 6 **Statistical analysis**

7
8 Samples from all groups within an experiment were processed at the same time. All
9 data are expressed as mean \pm SE and obtained from a minimum of 3 and a maximum
10 of 7 animals. Statistical differences were determined by using Graph Pad Prism (v.5.0.)
11 software (GraphPad Software, Inc., La Jolla (CA) USA). The effect of obesity and/or
12 CORT deficiency on transcript expression profile and circulating insulin levels in cort+/+
13 and cort -/- mice was assessed by the Student's t-test and by ANOVA, followed by
14 Fisher's post-hoc test for multiple comparisons. $P < 0,05$ was considered significant.

15 16 **Results**

17 18 **Ghrelin system expression at the pancreas of cort+/+ and cort -/- mice.**

19 Expression of ghrelin, In1-ghrelin variant, GHS-R and GOAT at the pancreas of cort+/+
20 and cort-/- mice were determined by qRT-PCR (Fig.1). All components of the ghrelin
21 system were expressed in pancreatic extracts of cort+/+ and cort-/- mice; however,
22 their relative expression levels markedly differed. Interestingly, In1-ghrelin expression
23 was substantially higher than that of ghrelin in cort+/+ mice (834.5 ± 92.48 vs. $14.4 \pm$
24 1.21 mRNA copies/NF per 100ng total RNA, respectively; $n=5$) as well as in cort-/
25 mice (1047.6 ± 105.42 vs. 16.0 ± 2.09 mRNA copies/NF per 100ng total RNA,
26 respectively; $n=4$) (Fig. 1). Moreover, GOAT was highly expressed as compared to
27 ghrelin expression (62.2 ± 9.98 mRNA copies/NF per 100ng total RNA), and GHS-R
28 showed low expression levels in cort +/+ mice under LFD (21.1 ± 3.65 mRNA
29 copies/NF per 100ng total RNA) (Fig. 1). Lack of CORT, did not alter the expression of
30 neither ghrelin forms nor GHS-R but significantly decreased GOAT expression ($32.3 \pm$
31 3.53 mRNA copies/NF per 100ng total RNA) (Fig. 1).

32 **Modulation of the different components of the ghrelin system at the whole** 33 **and endocrine pancreas level in obese cort+/+ and cort-/- mice.**

34 Administration of HFD to prepuberal animals (4 wk of age) during 16 wk period caused
35 a dys-regulation of some of the components of the ghrelin system at both whole and

1 endocrine pancreas of cort+/+ animals (white columns in Fig 1 and 2). In particular,
2 ghrelin, In1-ghrelin and GHS-R transcript levels were significantly higher in the whole
3 pancreas of cort+/+ animals fed with HFD, while GOAT mRNA levels remained
4 unchanged (white columns in Fig 1).

5 Similarly, ghrelin and GHS-R transcript expression were increased at the endocrine
6 pancreas under HFD conditions, while In1-ghrelin and GOAT were not altered (white
7 columns in Fig 2).

8 Absence of CORT prevented the increase induced by obesity in ghrelin, In1-ghrelin
9 and GHS-R transcripts, and even caused a significant reduction in the expression of
10 such transcripts (black columns in Fig 1). Indeed, all ghrelin-system components were
11 significantly decreased in obese cort-/- compared with obese cort+/+ mice (Figure-1).
12 When comparing the changes in the ghrelin-system at the pancreatic islet level with
13 those observed at the whole pancreas, we observed a similar, albeit not identical,
14 dysregulation of ghrelin system expression (black columns in Fig 2). Specifically,
15 ghrelin, and GHS-R transcript levels were also significantly higher in obese vs. lean
16 cort+/+ mice, changes that were not observed in obese cort-/- mice. However, In1-
17 ghrelin transcripts remained unchanged at the endocrine pancreas of cort-/- obese
18 mice, while its mRNA level significantly increased as a consequence of a HFD in cort -
19 /- mice (Fig. 2).

20 **Modulation of plasma insulin levels as well as insulin expression at the**
21 **whole and endocrine pancreas level in obese cort+/+ and cort-/- mice.**

22 Expression of both mouse insulin transcripts as well as plasma insulin levels were
23 analyzed in cort+/+ and cort-/- mice under LFD and HFD conditions. As expected, in
24 cort+/+ mice under obesity conditions insulin transcripts were significantly elevated in
25 the whole pancreas (white columns in Fig 3 A and B) while, at pancreatic islet level,
26 only insulin-2 was significantly elevated (white columns in Fig 4). Plasma insulin levels
27 were also significantly elevated in cort +/+ mice under obesity conditions (white
28 columns in Fig 3C). Importantly, the increased levels of both transcript and plasma
29 insulin as a consequence of an obese state were completely prevented in the absence
30 of endogenous CORT (black columns in Fig 3A, 3B and 4).

31

32

33

1 Discussion

2 This study demonstrates that endogenous cortistatin markedly influences the
3 constitutive expression pattern of various components of the pancreatic ghrelin system
4 under both normal and obesity conditions. In addition, our data support the idea that
5 cortistatin play important actions on pancreatic function, in particular, by preventing the
6 observed increase in the expression of insulin and its circulating plasma levels in obese
7 mice.

8 Recently, several studies described that the pancreas synthesizes all different
9 components of ghrelin system, as reported in the beta, epsilon or another endocrine
10 cells [7,8,10,11,12,14,21,22,23,24,25]. Accordingly, besides the well documented
11 regulation of pancreatic function by ghrelin from stomach origin [26,27,28,29], it has
12 been also proposed that locally produced ghrelin may have a role on pancreatic
13 function and, specifically, on glucose homeostasis. Indeed, Dezaki *et al.* suggested that
14 locally produced ghrelin regulates insulin production in a paracrine manner [30],
15 although this aspect is still controversial [4] and consequently, a definitive role has not
16 been defined yet. In the present study, we confirmed pancreatic expression of ghrelin
17 system components (ghrelin, In1-ghrelin, GHS-R and GOAT) at the whole and
18 endocrine pancreas of control mice but also of cort^{-/-} mice. In addition, a significant
19 down-regulation of GOAT transcripts was observed in cort^{-/-} mice, suggesting a
20 possible regulation of ghrelin actions by cortistatin at pancreatic level. Similarly to that
21 reported at the pituitary and hypothalamus [5], we also observed that pancreatic In1-
22 ghrelin expression was significantly higher than that of native ghrelin, thus supporting
23 that this variant might be the dominant ghrelin-transcript at the pancreatic level, and
24 also suggesting that it may exert important biological actions through a receptor still to
25 be identified. Of note, In1-ghrelin variant retains the acylation site of pre-proghrelin [12]
26 and, consequently, it may encode a peptide that can also be targeted as a substrate for
27 GOAT action, an issue that should be further investigated. Based on the observed
28 down-regulation of GOAT expression in cort^{-/-} mice, CORT might also regulate the
29 putative pancreatic function of In1-ghrelin by regulating its possible acylation and
30 consequently diminishing its local activity, another aspect that needs further attention.

31
32 It has been previously reported that ghrelin system components are regulated by
33 certain metabolic conditions, like obesity, at the stomach, pituitary and hypothalamus
34 [17,19,31]. In line with this, the present report is the first to reveal, to the best of our
35 knowledge, that ghrelin system components are also markedly altered under DIO
36 conditions at pancreatic level. However, contrary to that previously reported at the

1 hypothalamic and pituitary level [17,19], we observed an up-regulation of ghrelin, In1-
2 ghrelin and GHS-R transcripts at the pancreas of cort+/+ animals under obesity
3 conditions, while GOAT expression level remains unaltered, thus supporting that
4 obesity-induced alterations in the ghrelin-system are tissue-dependent. It is well known
5 that obesity is a chronic inflammation condition that at pancreatic level causes a
6 deleterious effect on pancreatic function and, in particular, on beta-cell function [32]. In
7 this sense, the observed increase in pancreatic ghrelin system expression may locally
8 acts as a protective mechanism by promoting beta-cell survival and growth, a function
9 that has been previously described for different ghrelin system components under
10 physiological or pathological conditions [33,34]. In addition, and similarly to that
11 described for pancreatic ghrelin system profile, In1-ghrelin variant transcripts are also
12 dominantly expressed under extreme metabolic conditions (obesity), again supporting
13 a relevant role for this ghrelin variant at the pancreatic level that could possible
14 contribute to the described actions for ghrelin related peptides on beta-cell survival
15 [33,34].

16

17 In clear contrast to the up-regulation of ghrelin system under HFD conditions in cort +/+
18 mice described above, we observed a clear shut-down of ghrelin system components
19 at the whole and endocrine pancreas in obese CORT deficient animals. These findings
20 would support a novel pathophysiological role of CORT in the pancreatic function in
21 individuals under metabolic stress (obesity). Conversely, at the endocrine pancreas,
22 In1-ghrelin transcripts increased in cort-/- obese animals, throughout a mechanism still
23 unclear that would specifically favor the splicing of ghrelin gene to generate In1-ghrelin
24 variant. Obviously, these findings suggest that native ghrelin and In-1 ghrelin variant
25 might be differentially regulated in cultured pancreatic islets in a similar manner to that
26 reported in the pituitary, hypothalamus and stomach [5,19,31] although this is an
27 aspect that needs further investigations.

28

29 Besides ghrelin expression, our data also reveal a significant increase of both insulin 1
30 and 2 mRNA transcripts in extracts from whole pancreas (only insulin 2 transcripts in
31 islet samples) under obesity conditions. Such transcript increase is well in agreement
32 with the elevation of plasma insulin levels in animals under obesity conditions observed
33 in this study and also with the documented by others [17,33,35]. However, in the
34 pancreas of animals lacking CORT expression and under HFD conditions, insulin
35 transcripts remain at control levels, although significantly diminished in islet samples,
36 thus suggesting and supporting a role for endogenous CORT in regulating endocrine
37 pancreas function, particularly on beta-cell function.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13

Conclusions

The present study provides empirical evidence for an increased pancreatic ghrelin system expression under obesity conditions. Although this is an experimental animal model, our results may offer new perspectives of what might be occurring during obesity at pancreatic level in humans. Moreover, our findings demonstrate that the lack of endogenous CORT (cort^{-/-} mice) prevents the up-regulation of all components of the pancreatic ghrelin system as well as insulin secretion (mRNA expression and release) induced in by an obesity state in cort^{+/+} mice, thereby suggesting that endogenous CORT may be a key regulator of pancreatic endocrine function under normal and possibly under pathophysiological states.

1 References.

- 2 1. Seim I, Collet C, Herington AC, Chopin LK (2007) Revised genomic structure of the
3 human ghrelin gene and identification of novel exons, alternative splice variants and
4 natural antisense transcripts. *BMC Genomics* 8: 298.
- 5 2. Seim I, Josh P, Cunningham P, Herington A, Chopin L (2011) Ghrelin axis genes,
6 peptides and receptors: recent findings and future challenges. *Mol Cell Endocrinol*
7 340: 3-9.
- 8 3. Zhang JV, Ren PG, Avsian-Kretchmer O, Luo CW, Rauch R, et al. (2005) Obestatin,
9 a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake.
10 *Science* 310: 996-999.
- 11 4. Bando M, Iwakura H, Ariyasu H, Hosoda H, Yamada G, et al. (2011) Transgenic
12 overexpression of intraislet ghrelin does not affect insulin secretion or glucose
13 metabolism in vivo. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 302: E403-408.
- 14 5. Kineman RD, Gahete MD, Luque RM (2007) Identification of a mouse ghrelin gene
15 transcript that contains intron 2 and is regulated in the pituitary and hypothalamus in
16 response to metabolic stress. *J Mol Endocrinol* 38: 511-521.
- 17 6. Gahete MD, Cordoba-Chacon J, Hergueta-Redondo M, Martinez-Fuentes AJ,
18 Kineman RD, et al. (2011) A novel human ghrelin variant (In1-ghrelin) and ghrelin-
19 O-acyltransferase are overexpressed in breast cancer: potential pathophysiological
20 relevance. *PLoS One* 6: e23302.
- 21 7. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, et al. (1999) Ghrelin is a
22 growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402: 656-660.
- 23 8. Date Y, Kojima M, Hosoda H, Sawaguchi A, Mondal MS, et al. (2000) Ghrelin, a
24 novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct
25 endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology*
26 141: 4255-4261.
- 27 9. van der Lely AJ, Tschop M, Heiman ML, Ghigo E (2004) Biological, physiological,
28 pathophysiological, and pharmacological aspects of ghrelin. *Endocr Rev* 25: 426-
29 457.
- 30 10. Ueberberg B, Unger N, Saeger W, Mann K, Petersenn S (2009) Expression of
31 ghrelin and its receptor in human tissues. *Horm Metab Res* 41: 814-821.
- 32 11. Granata R, Baragli A, Settanni F, Scarlatti F, Ghigo E (2010) Unraveling the role of
33 the ghrelin gene peptides in the endocrine pancreas. *J Mol Endocrinol* 45: 107-118.
- 34 12. Yang J, Brown MS, Liang G, Grishin NV, Goldstein JL (2008) Identification of the
35 acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone.
36 *Cell* 132: 387-396.
- 37 13. Yang J, Zhao TJ, Goldstein JL, Brown MS (2008) Inhibition of ghrelin O-
38 acyltransferase (GOAT) by octanoylated pentapeptides. *Proc Natl Acad Sci U S A*
39 105: 10750-10755.
- 40 14. Gutierrez JA, Solenberg PJ, Perkins DR, Willency JA, Knierman MD, et al. (2008)
41 Ghrelin octanoylation mediated by an orphan lipid transferase. *Proc Natl Acad Sci U*
42 *S A* 105: 6320-6325.
- 43 15. Broglio F, Grottoli S, Arvat E, Ghigo E (2008) Endocrine actions of cortistatin: in
44 vivo studies. *Mol Cell Endocrinol* 286: 123-127.
- 45 16. Cordoba-Chacon J, Gahete MD, Pozo-Salas AI, Martinez-Fuentes AJ, de Lecea L,
46 et al. (2011) Cortistatin is not a somatostatin analogue but stimulates prolactin
47 release and inhibits GH and ACTH in a gender-dependent fashion: potential role of
48 ghrelin. *Endocrinology* 152: 4800-4812.
- 49 17. Luque RM, Gahete MD, Hochgeschwender U, Kineman RD (2006) Evidence that
50 endogenous SST inhibits ACTH and ghrelin expression by independent pathways.
51 *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291: E395-403.
- 52 18. Li DS, Yuan YH, Tu HJ, Liang QL, Dai LJ (2009) A protocol for islet isolation from
53 mouse pancreas. *Nat Protoc* 4: 1649-1652.

- 1 19. Luque RM, Kineman RD (2007) Gender-dependent role of endogenous
2 somatostatin in regulating growth hormone-axis function in mice. *Endocrinology* 148:
3 5998-6006.
- 4 20. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, et al. (2002)
5 Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric
6 averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3: RESEARCH0034.
- 7 21. An W, Li Y, Xu G, Zhao J, Xiang X, et al. (2010) Modulation of ghrelin O-
8 acyltransferase expression in pancreatic islets. *Cell Physiol Biochem* 26: 707-716.
- 9 22. Veldhuis JD, Bowers CY (2010) Integrating GHS into the Ghrelin System. *Int J Pept*
10 2010.
- 11 23. Sakata I, Yang J, Lee CE, Osborne-Lawrence S, Rovinsky SA, et al. (2009)
12 Colocalization of ghrelin O-acyltransferase and ghrelin in gastric mucosal cells. *Am*
13 *J Physiol Endocrinol Metab* 297: E134-141.
- 14 24. Gnanapavan S, Kola B, Bustin SA, Morris DG, McGee P, et al. (2002) The tissue
15 distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans.
16 *J Clin Endocrinol Metab* 87: 2988.
- 17 25. Sun Y, Garcia JM, Smith RG (2007) Ghrelin and growth hormone secretagogue
18 receptor expression in mice during aging. *Endocrinology* 148: 1323-1329.
- 19 26. Dezaki K, Hosoda H, Kakei M, Hashiguchi S, Watanabe M, et al. (2004)
20 Endogenous ghrelin in pancreatic islets restricts insulin release by attenuating Ca²⁺
21 signaling in beta-cells: implication in the glycemic control in rodents. *Diabetes* 53:
22 3142-3151.
- 23 27. Date Y, Nakazato M, Hashiguchi S, Dezaki K, Mondal MS, et al. (2002) Ghrelin is
24 present in pancreatic alpha-cells of humans and rats and stimulates insulin
25 secretion. *Diabetes* 51: 124-129.
- 26 28. Wierup N, Svensson H, Mulder H, Sundler F (2002) The ghrelin cell: a novel
27 developmentally regulated islet cell in the human pancreas. *Regul Pept* 107: 63-69.
- 28 29. Prado CL, Pugh-Bernard AE, Elghazi L, Sosa-Pineda B, Sussel L (2004) Ghrelin
29 cells replace insulin-producing beta cells in two mouse models of pancreas
30 development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 2924-2929.
- 31 30. Dezaki K, Kakei M, Yada T (2007) Ghrelin uses Galphai2 and activates voltage-
32 dependent K⁺ channels to attenuate glucose-induced Ca²⁺ signaling and insulin
33 release in islet beta-cells: novel signal transduction of ghrelin. *Diabetes* 56: 2319-
34 2327.
- 35 31. Gahete MD, Cordoba-Chacon J, Salvatori R, Castano JP, Kineman RD, et al.
36 (2010) Metabolic regulation of ghrelin O-acyl transferase (GOAT) expression in the
37 mouse hypothalamus, pituitary, and stomach. *Mol Cell Endocrinol* 317: 154-160.
- 38 32. Donath MY, Shoelson SE Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat Rev*
39 *Immunol* 11: 98-107.
- 40 33. Granata R, Gallo D, Luque RM, Baragli A, Scarlatti F, et al. (2012) Obestatin
41 regulates adipocyte function and protects against diet-induced insulin resistance and
42 inflammation. *FASEB J*.
- 43 34. Favaro E, Granata R, Miceli I, Baragli A, Settanni F, et al. (2012) The ghrelin gene
44 products and exendin-4 promote survival of human pancreatic islet endothelial cells
45 in hyperglycaemic conditions, through phosphoinositide 3-kinase/Akt, extracellular
46 signal-related kinase (ERK)1/2 and cAMP/protein kinase A (PKA) signalling
47 pathways. *Diabetologia* 55: 1058-1070.
- 48 35. Luque RM, Lin Q, Cordoba-Chacon J, Subbaiah PV, Buch T, et al. (2011)
49 Metabolic impact of adult-onset, isolated, growth hormone deficiency (AOiGHD) due
50 to destruction of pituitary somatotropes. *PLoS One* 6: e15767.
- 51
- 52

Figure legends.

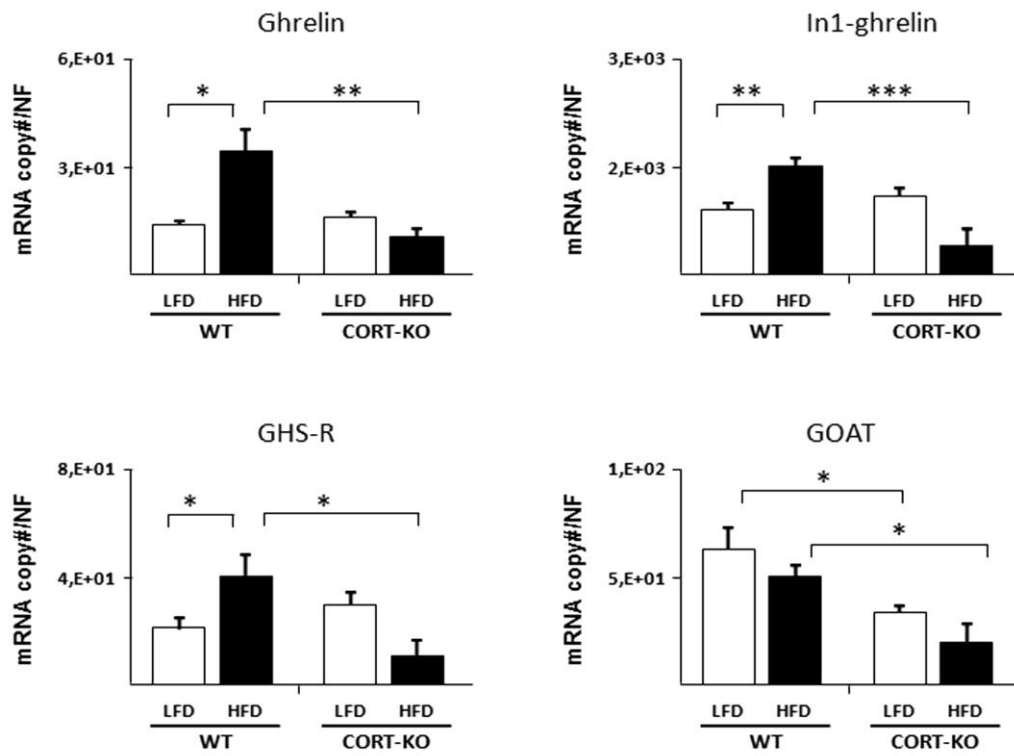
Fig. 1.: Expression level of different ghrelin system components at the whole pancreas of cort+/+ and cort-/- male mice subjected to low fat (LF) or high fat diet (HFD). Values represent mean \pm SEM of copy number adjusted by normalization factor (NF) per 100 ng of cDNA obtained from 3-7 animals per experimental group. (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).

Fig. 2.: Expression level of different ghrelin system components at pancreatic islets of cort+/+ and cort-/- male mice subjected to low fat (LF) or high fat diet (HFD). Values represent mean \pm SEM of copy number adjusted by normalization factor (NF) per 100 ng of cDNA obtained from 4-7 animals per experimental group. (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).

Fig. 3.: Expression profile of Insulin 1 and insulin 2 mRNA transcripts (panels A and B, respectively) at the whole pancreas of cort+/+ and cort-/- male mice subjected to low fat (LF) or high fat diet (HFD). C, plasma insulin level obtained from cort+/+ and cort-/- animals under LF- or HF-diets. Values represent mean \pm SEM of copy number adjusted by normalization factor (NF) per 100 ng of cDNA obtained from 4-7 animals per experimental group. (*: $p < 0,05$).

Fig. 4.: Expression profile of Insulin 1 and insulin 2 mRNA transcripts at pancreatic islets of cort+/+ and cort-/- male mice subjected to low fat (LF) or high fat diet (HFD). Values represent mean \pm SEM of copy number adjusted by β -actin expression per 100 ng of cDNA obtained from 2-3 animals per experimental group. (*: $p < 0,05$).

1 Fig. 1.



2

3

4

5

6

7

8

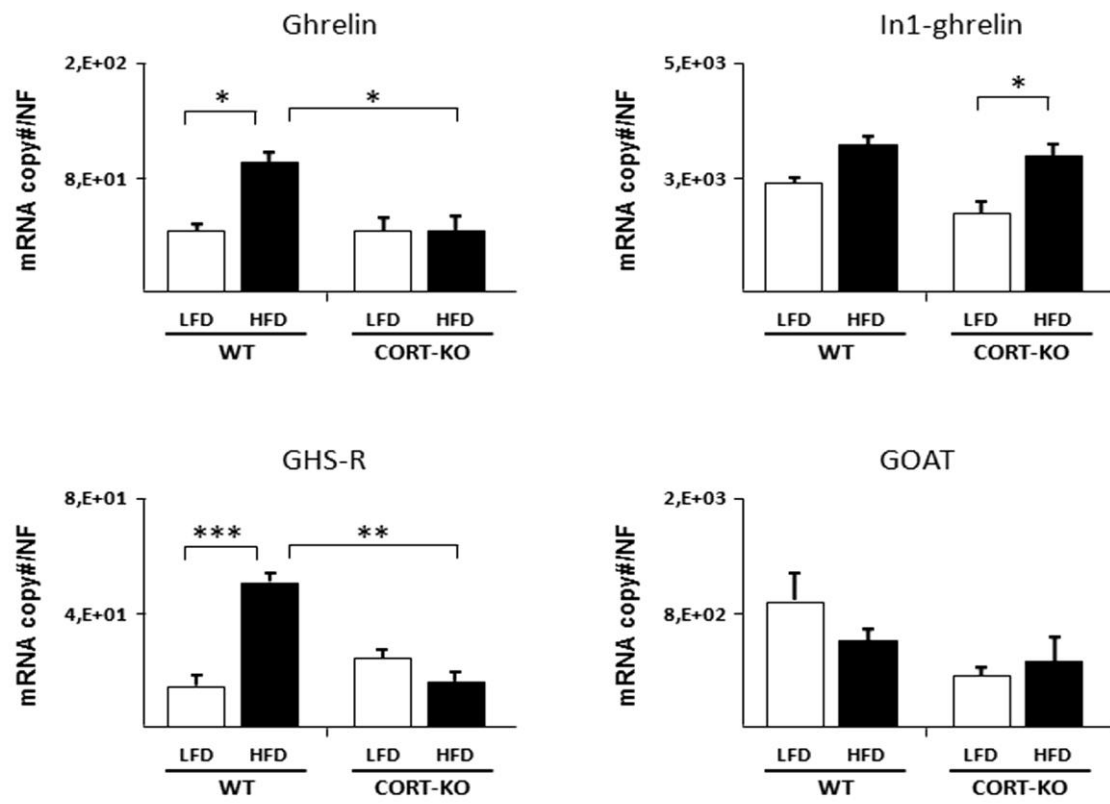
9

10

11

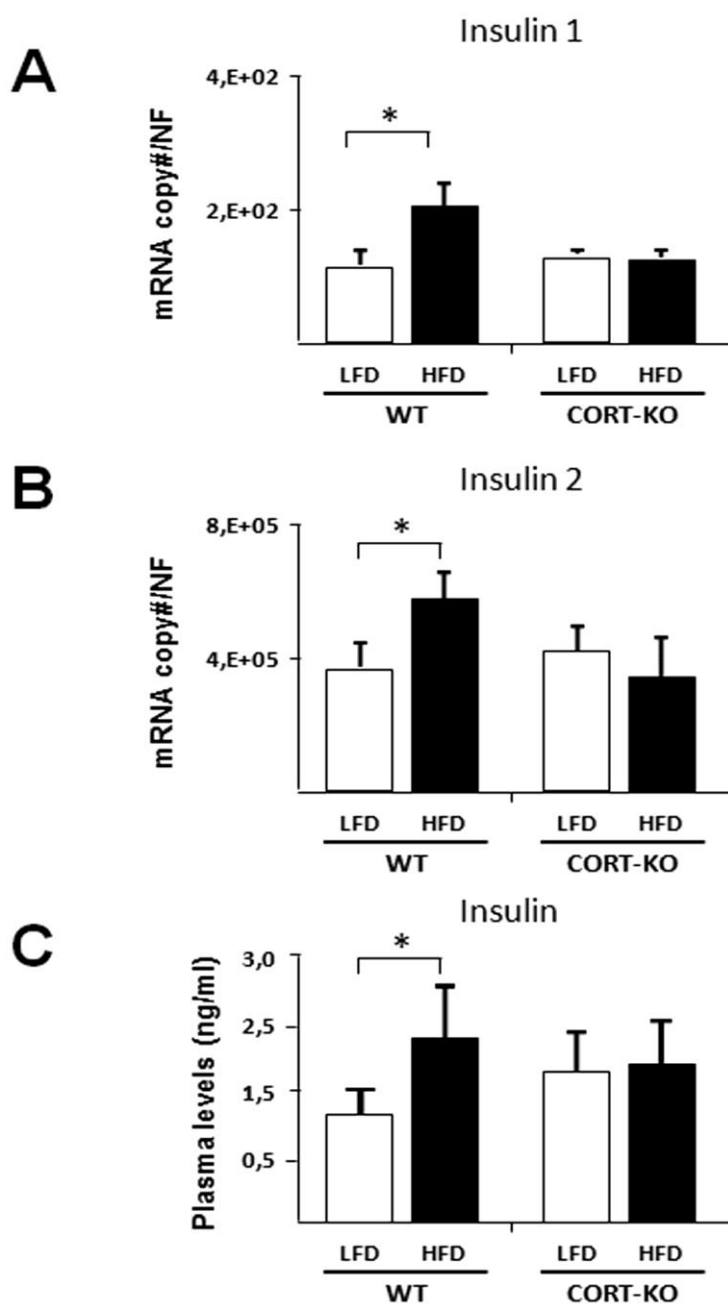
12

1 Fig. 2.



2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12

1 Fig. 3.



2

3

4

5

6

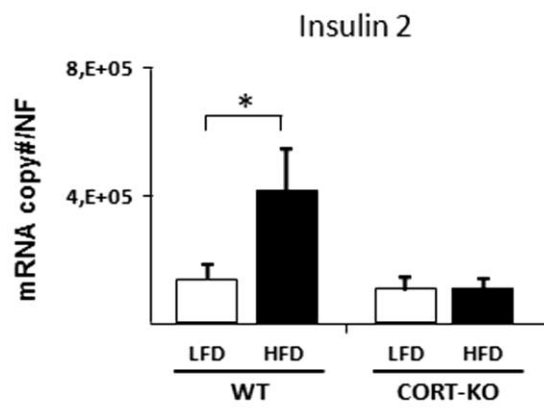
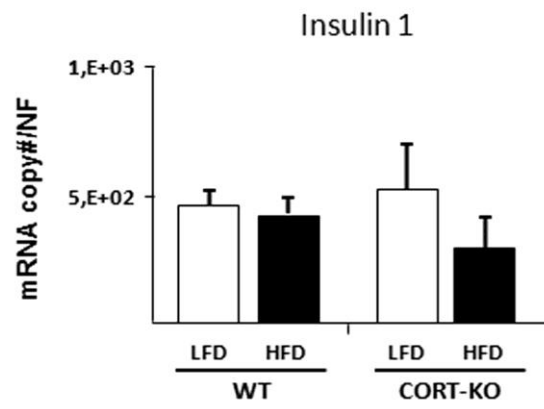
7

8

9

1 Fig.4

2



3

4

5

6

7

8

9