

Departament de Nutrició i Bromatologia  
Facultat de Farmàcia  
Universitat de Barcelona

MECANISMES D'ACCIÓ DE L'OLEAT D'ESTRONA: EFECTES A  
CURT TERMINI SOBRE EL TEIXIT ADIPÓS BLANC

**ANNA SALAS MANI**  
Barcelona, Setembre de 2006



MEMÒRIA PER OPTAR AL GRAU DE DOCTOR EN BIOLOGIA  
PROGRAMA DE DOCTORAT DE BIOMEDICINA, BIENNI 1999-2001  
DEPARTAMENT DE NUTRICIÓ I BROMATOLOGIA  
UNIVERSITAT DE BARCELONA

Presentada per

**ANNA SALAS MANI**

Vist i plau dels directors

**Dr. Xavier Remesar**

Catedràtic de Nutrició i Bromatologia

**Dra. Montserrat Esteve**

Prof Agregat Nutrició i Bromatologia

Departament de Nutrició i Bromatologia

Universitat de Barcelona

La interessada

Anna Salas Mani



*"L'important és no deixar de fer-se preguntes"*

Albert Einstein



Bé, ja hi som, tots plegat m'heu ajudat a arribar a fins aquí... N'hem passat tantes de peripècies abans d'arribar al dia d'avui... que se'm fa estrany que això s'acabi!! Dins meu hi ha una barreja d'emocions que no crec que es puguin expressar en paraules, però que aquells que ja heu passat per aquí, sabeu què vull dir, i els que encara no hi heu passat, aviat m'entendreu... En paraules podríem dir: per fi..., ja?, de veritat?, uf!!, oh!!, que bé!! Descans i alleujament però també nervis i emoció, felicitat i pena... Però sobretot, i el més important... Gràcies!!

Amb molts de vosaltres ja fa més de 6 anys que ens coneixem, que compartim laboratori, projectes, idees, vivències, i tantes altres coses de la vida quotidiana.

El qui em va permetre tots aquests anys d'aprenentatge i formació vas ser tu, Xavier. No només has exercit plenament de director de tesi sinó que m'has fet una mica de pare en aquest període d'educació científica... i el més important, gràcies per creure en mi! No oblidaré tampoc com m'has ajudat a superar aquesta assignatura tant dura i pesada de la tesi que és la burocràcia, mai no ho hauria aconseguit sense tu!!

Ai Montse, t'ho creus, que casi ho hem aconseguit? Jo encara no, i suposo que tu tampoc... El cert és que les hem vistes de tots colors, i sempre m'has ajudat a continuar el camí, a no mirar enrere i a treure les forces quan ja no en quedaven... Però cal dir que ha valgut la pena compartir amb tu les penes (moltes!) i les alegries (algunes...) d'aquesta tesi. I sí, tu també m'has fet de mare (a més de directora, clar!); m'has dut de la ma durant molt temps, fins que em vaig fer gran per caminar sola amb el teu recolzament. T'he d'agrair la teva paciència infinita, les mil frases fetes catalanes que m'has ensenyat i també els teus útils consells gastronòmics durant els cents de dinars que varem compartir en els meus inicis, tant de laboratori com de cuina!!

Marià, gracies per deixar-me participar d'aquest projecte tant engrescador que és l'oleat d'estrone i per transmetre'm la teva extensa cultura en totes les vessants: lingüística, gastronòmica, històrica i com no, científica.

"Jose, gracias por estar allí cuando he necesitado cualquier cosa, desde un CD o un boli hasta un consejo para el depósito de la tesis."

Els primers passos els vaig fer al teu costat, Mar. Encara que va ser poc el temps que varem compartir plegades al laboratori, no cal dir que no per curt va ser poc intens. Em vas contagiar el teu entusiasme des del primer dia... per la ciència i per la vida!!

Les doctores més joves, Ruth i Cris. Tants consells i tants ànims... Ruth, què hauria fet jo sense les teves contínues recerques bibliogràfiques, les traduccions anglosaxones i les teves xerrades de germana gran... Cris: què hauria estat d'aquesta tesi sense els teus

somriures incondicionals!! Si n'hem rigut de cops plegades!! Ho trobaré a faltar... Tu també has col·laborat a ampliar la meva cultura gastronòmica més sana!!

Amb la Marta D varem començar aquesta aventura juntes, i sempre ens hem fet costat... La meva companya d'esmorzars per agafar energia per afrontar el nou dia de feina... Quantes xerrades al bar t'he d'agrair, en els bons i mals moments... Gràcies per escoltar-me tant i entendre'm sempre, per solidaritzar-te i recolzar-me, i gràcies per la teva companyia al lab a altes hores de la tarda... Sobretot, no desisteixis, el bo es fa esperar, tot arribarà!!

Després de la Marta van aparèixer al laboratori la nova generació, a totes vosaltres, gràcies per deixar-me compartir amb vosaltres tantes coses. Potser la primera d'arribar va ser la Bea, amb la seva inseparable Susana... No he vist mai una parella de treball tant ben avinguda... La Susana se'n va anar al Vall d'Hebron, però gràcies a ella i al grup de pneumo, he pogut acabar d'escriure la tesi, tu ja saps que vull dir... Què dir de la Bea, tantes coses ens uneixen i ens han unit... El pis, la tesi, el jefe, l'amistat, el barri, i espero que ben aviat el bodorrio!! A tu també et dic: no desisteixis... algun dia seràs tu qui portarà el vestit blanc!! Una altra cosa també t'hauria de dir: gràcies per acompanyar-me a casa en tantes ocasions, per compartir taxi a altes hores de la nit, i gràcies per confiar-me tants secrets i posar-me al dia de les últimes novetats sempre recent sortides del forn!! Raquel, fa molts anys que ens coneixem, varem coincidir a la carrera, però mai hagués dit que poguéssim arribar a compartir tantes coses. No cal dir que també hi ha mil coses que ens uneixen i que hem viscut juntes, però principalment t'he d'agrair que siguis com ets... tant sincera i segura del que vols. Gràcies pel teu recolzament i per escoltar-me en tantes ocasions... Ara no recordo qui va ser el següent fitxatge, la Mar o la Marta. Mar, com ho resumiria en poques línies... Gràcies per tants cops de mà com m'has donat en les tècniques més novedoses i gràcies per tantes xerrades interessants i enriquidores sobre ciència. "Que coses no, Mar?" I què hauria fet sense els punts de sinceritat de la Marta? Li donen al dia a dia una gràcia especial, perquè tu t'atreveixes a dir el que ningú no diria... i això, en certs casos és molt admirable!! Però t'he de dir que he descobert el gran cor que amagues dins teu...

Gràcies també a la nova marona del grup, la Mercè!! Gràcies per ampliar-me el crèdit de la fotocopidora tantes vegades, per lluitar amb la gestoria per mi i gràcies per deixar-me l'ordinador en moltes ocasions per escriure aquest treball...

A totes us he d'agrair el vostre interès per mi i la tesi. Durant molt temps heu sabut veure quan necessitava parlar del tema i quan volia evitar-lo. Perdoneu-me doncs per aquests moments i gràcies per entendre'm!! Per cert, a totes vosaltres, us prometo fer neteja de les meves caixes del congelador i del meu book un cop acabi amb tot això!!!



I també gràcies als qui han anat passant pel laboratori: Jesus, Rosa, Helena, Paulina, Maite, David, Clara, Ana, Ricard i Gemma. Encara que ja no sou al laboratori, tots m'heu ajudat a la vostra manera en el seu moment... Sobretot, vull recordar la Pilar, la que va ser als meus inicis la meva directora... "Gracias Pili!"

I com no, les companyes de Càncer (Gemma, Silvia, Mayte, Vane, Rodrigo i Eli), que en alguns moments he sentit que formaven part del mateix grup... Gràcies Gemma per compartir amb mi tantes coses, i per confiar en mi moltes vegades... Gràcies a totes vosaltres per estar allà quan necessitava un consell o un reactiu...

Gràcies també a les noies d'RST (Miriam, Helena, Sonia...), amb les que varem començar plegades i tot i que ara ja no es troben tant properes al laboratori sempre han mostrat molt interès i m'han ajudat quan ha calgut.

Gràcies també a molta gent d'altres grups del departament de Bioquímica (LPL, EGF, Insulina, MP i TAM) per ajudar-me moltes vegades, a cultius, al laboratori....

I com no també he de donar les gràcies a les secres del departament de Bioquímica, a la Imma i la Carmen de Radioisòtops, a la gent de l'estabulari... Perquè m'heu fet la feina més fàcil!!

Moltes gràcies també per deixar-me treballar amb ells al grup del Carles Ciudad de Bioquímica de Farmàcia, principalment a tu, Carles, la Vero i com no la Silvia. Gràcies per introduir-me al món dels arrays i per deixar-me tant temps el vostre ordinador per fer llistes... Gràcies per la vostra paciència...

Gràcies a tot el grup Garbí (Carlos, Eli, Irene, Roser, Sebas i Xavi!!), per preocupar-vos per mi i per la meva tesi. Gràcies també a vosaltres, Sergi i Iratxe per aquests soparets fantàstics que em compartit durant tot aquest temps!!

I encara em queda l'agraïment més important, als qui dec haver arribat on sóc i ser com sóc, la família. Mama, gràcies per ensenyar-me tantes coses de la vida i per preocupar-te tant per mi a totes hores... Papa, gràcies per mostrar interès per la meva feina i per aquestes barbacoes tant bones del cap de setmana que et fan oblidar tots els mals... I com no, gràcies Marta per escoltar-me mils de vegades els meus rotllos laborals i aconsellar-me des de la teva experiència... També m'han ajudat a esbargir-me i desconnectar dels experiments frustrats els més petits, Àlex i Òscar, nebots i fillollets... I gràcies també als avis per tot el que m'heu donat i per preocupar-vos per mi. Els tiets, especialment el tiet Jordi, que em va introduir en aquest món i em va permetre conèixer aquest grup. I també gràcies a la meva nova família (Tanyà i Roig) que en diferents graus heu col·laborat en aquesta tesi amb el vostre interès i comprensió...

## Agraïments

---

I finalment, de tot cor, moltes gràcies Lluís per escoltar tantes vegades els meus rotllos impressionants i tenir tanta paciència, per aconseguir fer-me somriure en els pitjors dels meus dies i per apreciar la meva feina. Podria dir mil coses de tu, però el que més t'agraeixo és que, a més del meu marit, siguis el meu amic. Gràcies per ser sempre al meu costat.

---

$^3\text{H}$	triti
ACTH	hormona adrenocorticotropina
ADN	àcid desoxiribonucleic
AGRP	proteïna relacionada amb Agouti
AMPc	monofosfat d'adenosina cíclic
ASP	proteïna d'estimulació d'acilació
ATP	trifosfat d'adenosina
Bcl-2	del gen B-Cell Leukemia/lymphoma-2
BSA	albúmina sèrica bovina
CART	trànscripció regulador de cocaïna i amfetamina
CBG	globulina lligadora de glucocorticoides
CCK	coleocistoquinina
CETP	proteïna transferidora d'esters de colesterol
CPT1b	carnitina palmitoil transferasa 1b
CRF	factor d'alliberament de corticotropina
CRH	hormona alliberadora de corticotropina
CS	sèrum boví
DABA	àcid diaminobenzoic
DHEA	deshidroepiandrosterona
DMEM	dulbecco's modified eagle's medium
DMSO	di-metil-sulfòxid
DNAc	àcid desoxiribonucleic complementari
E	estrone
EDTA	àcid etilendiaminotetraacètic
FABP4	proteïna lligadora d'àcids grassos
FATP	proteïna transportadora d'àcids grassos
FBS	sèrum fetal boví
GAL	galanina
GALP	pèptid galanin-like
GH	hormona del creixement
GIP	polipèptid insulínotrop dependent d'insulina
GLP	pèptid glucagó-like
HDL	lipoproteïnes d'alta densitat
HEPES	àcid 4-(2-hidroxietil)-1-piperazonaetanosulfònic
HSL	lipasa sensible a les hormones
IBMX	1-metil-3-isobutilxantina
IL	interleucina

## Abreviatures

---

IMC	índex de massa corporal
LDL	lipoproteïnes de baixa densitat
LM	l·ligació mediatitzada
LPL	lipoproteïna lipasa
MCH	hormona concentradora de melanina
MCP-1	proteïna quimioattractant de monòcits 1
NEFA	àcids grassos lliures
NPY	neuropèptid Y
OE	oleat d'estrone
PAI-1	inhibidor de l'activador del plasminògen 1
PBS	tampó fosfat salí
PCR	reacció en cadena de la polimerasa
PMSF	fluorur de fenilmetilsulfonil
POMC	proopiomelanocortina
PPAR $\gamma$	receptor d'activació de proliferació peroxisomal gamma
PPY	pèptid YY
RBP	proteïna l·ligadora de retinol
RNA	àcid ribonucleic
RNA $m$	àcid ribonucleic missatge
RT	retrotranscripció
SDS	dodecil sulfat sòdic
SEM	error estàndard de la mitjana
SNC	sistema nerviós central
TAB	teixit adipós blanc
TAG	triacilglicerols
TGF- $\beta$	factor de transformació del creixement
TLC	cromatografia de capa prima
TNF $\alpha$	factor de necrosi tumoral $\alpha$
TZD	tiazolidindiones
VEGF	factor de creixement endotelial vascular
VLDL	lipoproteïna de molt baixa densitat

# ÍNDEX



<b>I. INTRODUCCIÓ</b>	<b>1</b>
1. CONTROL DE PES CORPORAL I OBESITAT	1
1.1. Control del pes corporal	1
1.1.1. Desajustos del control del pes corporal	2
1.1.1.1. L'obesitat	2
1.1.1.2. Baix pes	4
1.2. Regulació del control pes corporal	5
1.2.1. Mecanismes de regulació de la ingesta	5
1.2.1.1. Molècules implicades en el control gastrointestinal de la ingesta	7
1.2.1.1.1. Ghrelina	7
1.2.1.1.2. Pèptid YY	7
1.2.1.1.3. Coleocistoquinina	8
1.2.1.1.4. Pèptid glucagó-like	8
1.2.1.2. Hormones implicades en el control a mig i llarg termini de la ingesta	9
1.2.1.2.1. Leptina	9
1.2.1.2.2. Insulina	10
1.2.1.3. Neuropeptids implicats en el control hipotalàmic de la ingesta	11
1.2.1.3.1. Neuropeptids orexigènics	12
1.2.1.3.1.1. Neuropeptid Y	12
1.2.1.3.1.2. Agouti-related protein	13
1.2.1.3.1.3. Galanina	13
1.2.1.3.1.4. Hormona concentradora de melanina	14
1.2.1.3.1.5. Orexines	14
1.2.1.3.2. Neuropeptids anorexigènics	15
1.2.1.3.2.1. Pro-opiomelanocortina	15
1.2.1.3.2.2. Trànscrip regulat per cocaïna i amfetamina	16
1.2.2. Mecanismes de regulació de la termogènesi	16
2. OLEAT D'ESTRONA	19
2.1. L'oleat d'estrona (OE) com a senyal de regulació del pes corporal: nova teràpia per l'obesitat	19
2.2. Efectes de l'OE	21
2.2.1. Efectes sobre el pes corporal i el metabolisme energètic.	21
2.2.2. Efectes sobre els metabòlits plasmàtics.	23
2.2.3. Efectes sobre el teixit adipós blanc.	25
2.3. Distribució i nivells d'OE	27

2.4. Mecanisme d'acció de l'OE.	29
<b>3. EL TEIXIT ADIPÓS BLANC (TAB)</b>	<b>31</b>
3.1. Concepte actual de TAB	31
3.2. Regulació dels dipòsits de greix: metabolisme	34
3.2.1. Regulació del catabolisme (lipòlisi)	35
3.2.2. Regulació de l'anabolisme: síntesi de TAGs i emmagatzematge	38
3.3. El TAB com a òrgan endocrí	42
3.3.1. Factor de necrosi tumoral $\alpha$ (TNF $\alpha$ )	44
3.3.2. Adiponectina	44
3.3.3. Leptina	45
3.4. Apoptosi	46
3.4.1. Definició d'apoptosi	46
3.4.2. Canvis a les cèl·lules durant l'apoptosi	46
3.4.3. Fases de l'apoptosi	47
3.4.4. Diferents vies de l'apoptosi	48
3.4.4.1. Via extrínseca d'apoptosi o dels receptors de la mort	48
3.4.4.2. Via intrínseca d'apoptosi o via mitocondrial	49
3.4.4.3. Altres vies de mort: la via del reticle endoplàsmic	50
3.4.4.4. Apoptosi independent de l'activació de les caspases	51
3.4.5. La família de bcl-2	51
3.4.6. Les caspases	53
3.4.7. Apoptosi i TAB	54
3.5. L'adipòcit com a model	57
<b>II. OBJECTIUS</b>	<b>61</b>
<b>III. MATERIALS I MÈTODES</b>	<b>67</b>
1. EXPERIMENTS "IN VITRO"	69
1.1. Cultius cel·lulars.	69
1.1.1. Tècniques generals de cultiu cel·lular	69
1.1.2. Medis de cultiu cèl·lules 3T3-L1	70
1.1.3. Protocol de divisió o sembra de subcultiu	72
1.1.4. Protocol de diferenciació	73
1.1.5. Protocol de congelació i descongelació	73
1.1.5.1. Medi de congelació	73
1.1.5.2. Protocol de congelació	73
1.1.5.3. Protocol de descongelació	74



---

1.1.6. Incubacions de cèl·lules 3T3-L1 amb OE en diferents vehicles	74
1.1.6.1. Síntesi d'OE radioactiu (OE- <sup>3</sup> H)	75
1.1.6.2. Diferents vehicles per la incubació de l'OE	77
1.1.6.2.1. OE en etanol	77
1.1.6.2.2. OE en intralípid	77
1.1.6.2.3. OE en HDL	79
1.1.7. Determinació de l'activitat lipolítica en adipòcits 3T3-L1	80
1.1.7.1. Determinació de glicerol en medi de cultiu	80
1.1.8. Valoració d'activitat esterasa en cèl·lules 3T3-L1	81
1.1.8.1. Processat del medi i les cèl·lules	82
1.1.8.2. Obtenció d'un extracte lipídic (Folch)	82
1.1.8.3. TLC per quantificar OE i E1	82
1.1.9. Fraccionament subcel·lular d'adipòcits 3T3-L1	83
1.1.9.1. Determinacions enzimàtiques per estimar la puresa de les fraccions	83
1.1.9.1.1 Determinació de l'activitat n-acetil-β-d-glucosaminidasa	86
1.1.9.1.2. Determinació de l'activitat 5'-nucleotidasa	87
1.1.9.1.3. Determinació de l'activitat glucosa-6-fosfatasa	89
1.1.9.1.4. Determinació de l'activitat succinat deshidrogenasa	90
1.1.10. Valoració d'activitat esterasa en fraccions subcel·lulars de 3T3-L1	91
1.1.11. Valoració de proteïna	92
1.2. Estudis de binding de receptors β-adrenèrgics	92
1.2.1. Obtenció de membrana d'adipòcits	93
1.2.2. Estudi de <i>binding</i> de competició	94
1.2.3. Experiment d'scathard	96
2. EXPERIMENTS "IN VIVO"	97
2.1. Animals i condicions d'estabulació	97
2.2. Tractaments amb oleat d'estrona	97
2.2.1. Dosi d'oleat d'estrona	97
2.2.2. Tractament a temps curt	98
2.2.3. Model pair-fed	99
2.3. Valoracions plasmàtiques	101
2.3.1. Metabòlits plasmàtics	101
2.3.1.1. Glucosa	101
2.3.1.2. Àcids grassos lliures	101
2.3.1.3. Triacilglicerols	102
2.3.1.4. Colesterol total	103
2.3.1.5. Colesterol HDL	103

2.3.1.6. 3- $\beta$ -hidroxibutirat	104
2.3.2. Hormones	104
2.3.2.1. Insulina	104
2.3.2.2. Leptina	105
2.3.2.3. Adiponectina	105
2.3.2.4. Estrona lliure	105
2.3.2.5. Oleat d'estrone	106
2.3.2.5.1. Protocol de saponificació	106
2.3.2.5.1. Protocol de valoració d'estrone total	107
2.4. Valoracions a partir de mostres de teixit de rata	108
2.4.1. Valoració de DNA a partir de teixit	108
2.4.1.1. Càlcul de cel·lularitat i massa cel·lular	109
2.4.2. Valoració de proteïna tissular	110
2.4.3. Valoració de glicogen tissular	111
2.4.4. Valoració de lípids tissulars	113
2.4.5. Valoració d'aigua tissular	114
2.5. Recanvi de colesterol	114
2.6. Manipulació d'àcids nuclèics	114
2.6.1. Extracció de DNA genòmic de teixits	118
2.6.2. Extracció d'RNA de teixits	119
2.6.3. Quantificació d'àcids nuclèics	121
2.6.4. Comprovació de l'estat dels àcids nuclèics	122
2.6.5. Electroforesi en gel d'agarosa	122
2.7. Valoració d'apoptosi (LM-PCR)	123
2.8. Estudi d'expressió gènica	128
2.8.1. Arrays de DNA	128
2.8.2. RT-PCR	131
2.8.2.1. Síntesi de l'ADNc (RT)	131
2.8.2.2. Disseny dels encebadors	131
2.8.2.3. PCR semiquantitativa	134
2.8.2.4. PCR en temps real	135
2.8.2.3.1. Quantificació relativa de l'expressió gènica	137
2.8.2.3.2. Anàlisi dels resultats	138

## **IV. RESULTATS** **139**

BLOC I: Efectes de l'oleat d'estrone "in vitro"	141
---	-----

---

1. Aproximació a la identificació del mecanisme d'acció de l'OE en adipòcits 3T3-L1	143
BLOC II: Efectes del tractament amb oleat d'estrona "in vivo"	163
1. Les rates tractades amb oleat d'estrona mantenen l'homeòstasi glucídica: comparació amb un model pair-fed	165
2. L'oleat d'estrona incrementa el recanvi de colesterol en plasma	181
3. El tractament a curt termini amb oleat d'estrona afecta selectivament l'expressió de PPAR ( $\gamma$ i $\beta$ ) i TNF $\alpha$ en diverses localitzacions de teixit adipós blanc	191
4. El tractament amb oleat d'estrona activa mecanismes apoptòtics en teixit adipós blanc.	199
5. El tractament a curt termini amb oleat d'estrona afecta profundament la mobilització i deposició de lípids en teixit adipós	
<b>V. DISCUSSIÓ GENERAL</b>	<b>221</b>
<b>VI. CONCLUSIONS</b>	<b>231</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>235</b>
<b>VIII. ANNEX PUBLICACIONS</b>	<b>267</b>



# **I. INTRODUCCIÓ**



# 1. CONTROL DE PES CORPORAL I OBESITAT

## 1.1. CONTROL DEL PES CORPORAL

Durant la vida adulta en la majoria d'espècies animals, el pes corporal es manté estable durant llargs períodes de temps (Anand, 1961). Aquest manteniment s'aconsegueix gràcies a una complexa interacció entre el comportament alimentari i l'activitat física amb l'emmagatzemament d'energia.

En l'edat adulta, els éssers humans experimentem un lleuger increment de pes corporal des dels 20 fins als 50 anys de vida (Forbes i col, 1970). La quantitat mitja de kilocalories anuals ingerides per un adult oscil·la sobre un milió de kilocalories, l'emmagatzemament de l' 1% d'aquesta energia suposaria un increment de pes de 1,5 Kg. Per tant, tenint en compte que el pes corporal es manté estable, hem de suposar l'existència d'un sistema de control de l'emmagatzematge i eliminació d'energia molt acurat (Weigle, 1994). Un altre fet que ens indica l'existència d'una regulació clara del pes corporal, és la ràpida recuperació de pes que es dona després d'una pèrdua de pes causada per una restricció de la ingesta quan aquesta es normalitza, o el cas contrari amb un increment de l'aport energètic (Tremblay i col, 1992).

Tot i l'existència d'aquesta regulació tant precisa a nivell de tot l'organisme, el pes corporal experimenta una gran variabilitat entre individus de la mateixa població, en comparació amb d'altres variables fisiològiques que estan sotmeses a regulació.

El control del pes i la composició corporal depenen directament del balanç energètic de l'organisme. El balanç energètic ve donat per la següent fórmula:

$$BE = \text{Ingesta energètica} - \text{Consum energètic}$$

La ingesta energètica l'aporten els nutrients de la dieta i el consum energètic el genera el metabolisme basal, l'activitat física i la termogènesi. Per tal que el sistema es mantingui en equilibri s'han de mantenir les entrades i sortides de l'equació iguals. Quan la ingesta energètica és superior al consum energètic es genera un balanç positiu que promourà una deposició de reserves grasses al teixit adipós i un increment de pes corporal. Quan, per contra, el consum energètic és superior a la ingesta, el balanç energètic serà negatiu i aquest induirà una disminució dels dipòsits adiposos i una reducció del pes.

En situació de normalitat, el balanç energètic oscil·la sense que es produeixin grans variacions dels dipòsits adiposos ni del pes corporal, donat que hi ha nombrosos mecanismes que actuen per mantenir un balanç energètic equilibrat. Aquests mecanismes

d'homeòstasi energètica són els responsables que el sistema es mantingui en equilibri i ens defensa d'un cert nivell d'adipositat. La regulació és generalment molt potent per tal d'induir la ingesta i reduir el consum energètic quan les reserves energètiques estan disminuïdes i la disponibilitat de combustibles és baixa, en canvi, el sistema és més dèbil quan s'ha de reduir la ingesta i incrementar el consum energètic perquè les reserves estan plenes (Berthoud i col, 2004).

Desajustos sostinguts del balanç energètic poden donar lloc a patologies associades a un nivell de reserves i un pes corporal fora de la normalitat. Aquest és el cas de la obesitat quan el balanç es manté positiu durant llargs períodes de temps o baix pes quan el balanç es manté negatiu.

### 1.1.1. DESAJUSTOS DEL CONTROL DEL PES CORPORAL

Una manera de quantificar o valorar el grau de sobrepès o baix pes d'un individu és emprant l'índex de massa corporal (IMC) o índex de Quetelet, que relaciona el pes corporal i l'alçada (pes (Kg) / alçada<sup>2</sup> (m<sup>2</sup>)). Aquest índex proporciona una mesura quantitativa de la composició de massa grassa de l'organisme, tot i que té les seves limitacions en ser aplicada de manera estricta. Aquest és el cas dels individus amb una elevada proporció de massa muscular, que tot i poder tenir un IMC propi d'un individu obès, la quantitat de massa grassa que puguin tenir és mínima. L'IMC és actualment el valor més emprat per valorar el grau de sobrepès o baix pes d'un pacient en l'àmbit clínic, tot i que existeixen d'altres paràmetres més fiables i informatius. El paràmetre més adient per valorar la situació nutricional en un pacient podria ser el percentatge de greix corporal, però la metodologia per determinar-lo de manera rutinària en clínica no té la suficient fiabilitat. En investigació s'han desenvolupat mètodes alternatius i més exactes per estimar la quantitat de massa grassa de l'organisme, com pot ser la hidrodensimetria (pes corporal sota l'aigua), difícil d'aplicar en individus humans.

En condicions normals l'IMC pot oscil·lar entre 19-25, fora d'aquest marge es pot considerar que la situació nutricional es troba descompensada, i per tant es pot considerar problemàtica. Els valors d'IMC entre 25-40 indiquen diferents graus de severitat de l'obesitat, mentre que per sota d'un IMC de 19 es considera pes insuficient o baix pes.

#### 1.1.1.1. Obesitat

L'obesitat és una de les patologies més comuns de la societat contemporània. La seva difusió epidèmica l'ha extès tant en els països en vies de desenvolupament com en els més desenvolupats.



L'obesitat es defineix com una acumulació excessiva i patològica de reserves lipídiques a l'organisme, que com ja s'ha dit, és principalment conseqüència d'un desequilibri entre la ingesta i la despesa energètica, resultant així un balanç positiu que genera deposició de greixos i conseqüentment un guany de pes corporal associat.

Sovint l'obesitat s'ha considerat conseqüència d'una excessiva disponibilitat d'aliment i del seu alt contingut lipídic (Rolls, 2000), però hi ha altres causes externes significatives com són l'estrès (Parham, 1999) o la l'activitat sedentària (Crawford i col, 1999). En els últims anys s'han fet molts estudis per esbrinar les causes genètiques de l'obesitat, però sembla que l'obesitat humana no és conseqüència d'una modificació genètica puntual sinó que més aviat és deguda a una interacció entre factors de predisposició gènica a l'obesitat i factors de caràcter ambiental. De fet, l'obesitat també pot ser causada per tot un conjunt d'anomalies metabòliques que es coneixen amb el terme de síndrome metabòlica que inclou, a més, hiperlipidèmia, hipertensió i resistència a la insulina (Vega, 2004).

En els últims anys s'han aportat noves evidències sobre altres possibles causes de l'obesitat. D'una banda hi ha la possibilitat d'infecció per virus. Així, s'ha demostrat que l'adenovirus humà 36, quan s'inocula a pollastres i rates (Dhurendhar i col., 2000), provoca obesitat en aquests animals, fins i tot de manera diferencial a l'acció d'adenovirus específics per aquestes espècies. Aquest mateix any, els mateixos investigadors han descrit que l'adenovirus 37 humà també incrementa l'adipositat i redueix els TAG circulants en un model animal (Whigham i col., 2006). D'altra banda, cada cop hi ha més evidències de que les interaccions mare-fetus en el desenvolupament poden causar greus alteracions en el pes corporal. Així, a partir de les dades de pes de ciutadans holandesos adults, les mares dels quals van patir fam quan estaven embarassades al final de la Segona Guerra Mundial, s'ha pogut determinar que els que van estar exposats a malnutrició en la primera meitat de la gestació presentaven una més gran incidència d'obesitat que no pas els que havien patit malnutrició en el darrer trimestre de gestació (Ravelli i col., 1976). A partir d'aquestes dades s'han realitzat molts experiments amb animals i molts estudis epidemiològics en humans, en els que s'ha demostrat convincentment que perturbacions en el desenvolupament *in utero* poden influir permanentment en el canvi de les estructures d'òrgans, i alterar els mecanismes homeostàtics de les cries. Aquest fenomen denominat també "programació gestacional" pot condicionar, sense que encara es conegui el mecanisme, l'aparició de malalties en l'adult com són l'obesitat, la diabetis i malalties cardiovasculars (Ross i Desai, 2005).

Les estratègies emprades per al tractament de l'obesitat s'han basat en la limitació de la ingesta o l'increment de la despesa energètica. El tractament clàssic per l'obesitat és encara l'ús de dietes hipocalòriques, sovint complementades amb exercici físic i educació

alimentaria. La cirurgia bariàtrica és, fins ara, pràcticament l'únic mètode prou efectiu per tractar l'obesitat mòrbida. També s'han utilitzat bloquejants de l'absorció dels nutrients mitjançant la inhibició específica d'enzims digestius. Hi ha un nombre considerable de fàrmacs que s'han emprat per tractar l'obesitat i encara més que s'estan estudiant o desenvolupant. Les drogues més àmpliament estudiades són les serotoninèrgiques i les adrenèrgiques. Les primeres ajuden el malalt a disminuir la gana i les segones actuen incrementant la producció de calor, i com a conseqüència el consum energètic. Diverses hormones i metabòlits s'han estudiat per tal de tractar l'obesitat, però fins ara no hi ha al mercat cap tractament prou efectiu que garanteixi la cura de la malaltia.

De fet l'obesitat és un desajust del control del pes corporal degut a un increment dels nivells de referència de greix corporal com a conseqüència d'un sistema de ponderostat alterat (King 1976), junt amb d'altres desajustos dels nivells de leptina, insulina, glucocorticoides i altres hormones. L'individu obès també disposa dels mecanismes compensatoris que eviten canvis en la quantitat de massa grassa quan s'intenta manipular el sistema de manera externa, ja sigui per mitjà de la restricció de la ingesta energètica o mitjançant fàrmacs que incrementin la termogènesi. Aquest fet, juntament amb l'acció contrarreguladora que exerceixen els corticosteroides, serien l'explicació de la manca d'efecte terapèutic de moltes estratègies contra l'obesitat (Fernández-López i col, 2002).

### 1.1.1.2. Baix pes

Les causes que poden conduir a una situació nutricional de baix pes poden ser molt diverses. Tal i com succeeix amb l'obesitat, no tots els casos de baix pes són conseqüència d'una alteració dels centres de control del pes corporal, tot i que en tots els casos es dona un balanç energètic negatiu prolongat, que per múltiples causes diferents, promou una reducció de les reserves de l'organisme. En alguns casos el balanç es manté sempre equilibrat, però amb uns nivells de reserves originals escassos. Tot i això les complicacions metabòliques i funcionals que provoca són molt diferents de les que comporta l'obesitat. La complicació més important que implica l'aprimament extrem és la caquèxia, una situació límit de la pèrdua de massa corporal que compromet la continuïtat de la vida (Olalla Gallo i col, 2004).

Malalties com el càncer provoquen un rapidíssim aprimament dels malalts que no seria justificable per les necessitats energètiques del pacient (Esper i Harb, 2005). Es produeix una pèrdua ràpida de les reserves grasses i de proteïna corporal que porten a una baix pes que pot complicar la malaltia i agreujar el pronòstic. Un altre model de pèrdua progressiva

de greix és l'ancianitat. L'envelliment comporta una forta pèrdua de massa grassa i muscular de les que encara no es coneixen les bases moleculars (Thomas, 2005)

L'anorèxia i la bulímia són unes de les causes més freqüents de baix pes l'actual societat moderna. Els estereotips actuals de bellesa i aspecte exerceixen una pressió social tant forta que condueixen a malalties psicològiques basades en aconseguir un pes ideal i una figura d'acord amb els prototips marcats. La anorèxia nerviosa es caracteritza per un bloqueig més o menys greu de la gana que afecta principalment a noies joves i que pot arribar a produir un aprimament exagerat més enllà de les possibilitats de recuperació de la proteïna del propi organisme (Patel i col, 1998; Rigaud, 2000). El cas de la bulímia nerviosa és similar a l'anorèxia, però en aquest cas hi ha atacs bulímics en els que el malalt pot arribar a ingerir grans quantitats d'aliment en un temps curt (Patel i col, 1998). La provocació del propi vòmit és el mètode utilitzat per buidar l'estómac per poder continuar menjant i calmar així la sensació d'angoixa produïda. Podríem dir que les complicacions associades d'aquestes malalties venen donades pel baix pes que s'assoleix, tot i que no s'ha de perdre de vista que tenen un origen psicològic, i que per tant requereixen d'una teràpia essencialment psicològica i conductista (Patel i col, 1998).

## **1.2. REGULACIÓ DEL CONTROL DEL PES CORPORAL**

La regulació del control del pes corporal es dona, principalment a dos nivells. En primer lloc existeix una modulació de la quantitat i qualitat de l'aliment ingerit per l'organisme, i en segon lloc es controla la sortida d'energia mitjançada per termogènesi. Els mecanismes de regulació que controlen aquestes variables del balanç energètic són molt complexes i en part, encara desconeguts, tot i que s'han estudiat exhaustivament en els darrers anys donada la seva rellevància per desenvolupar noves teràpies per l'obesitat. El que sí és conegut, i s'ha de tenir en compte, és que aquesta regulació té una capacitat de compensació davant dels intents externs de modificació que dificulta l'actuació de molts dels fàrmacs destinats a modular el pes corporal.

### **1.2.1. MECANISMES DE REGULACIÓ DE LA INGESTA**

La ingesta dels aliments és un procés que depèn de factors interns i factors externs o ambientals. Des del punt de vista ambiental hi ha nombrosos aspectes sensorials (olor, vista, gust, tacte) o inclús de caràcter social (publicitat, modes, conductes socials) que ens influeixen a l'hora d'ingerir aliments. Podríem dir que hi ha dos tipus de mecanismes interns de control de la ingesta: un control a curt termini, que principalment es durà a terme per senyals físiques (distensió gàstrica) i per l'alliberació de pèptids gastrointestinals; i un control

a mitjà o llarg termini, basat en senyals d'adipositat (leptina i insulina) que indiquen els nivells de reserves grasses de l'organisme.

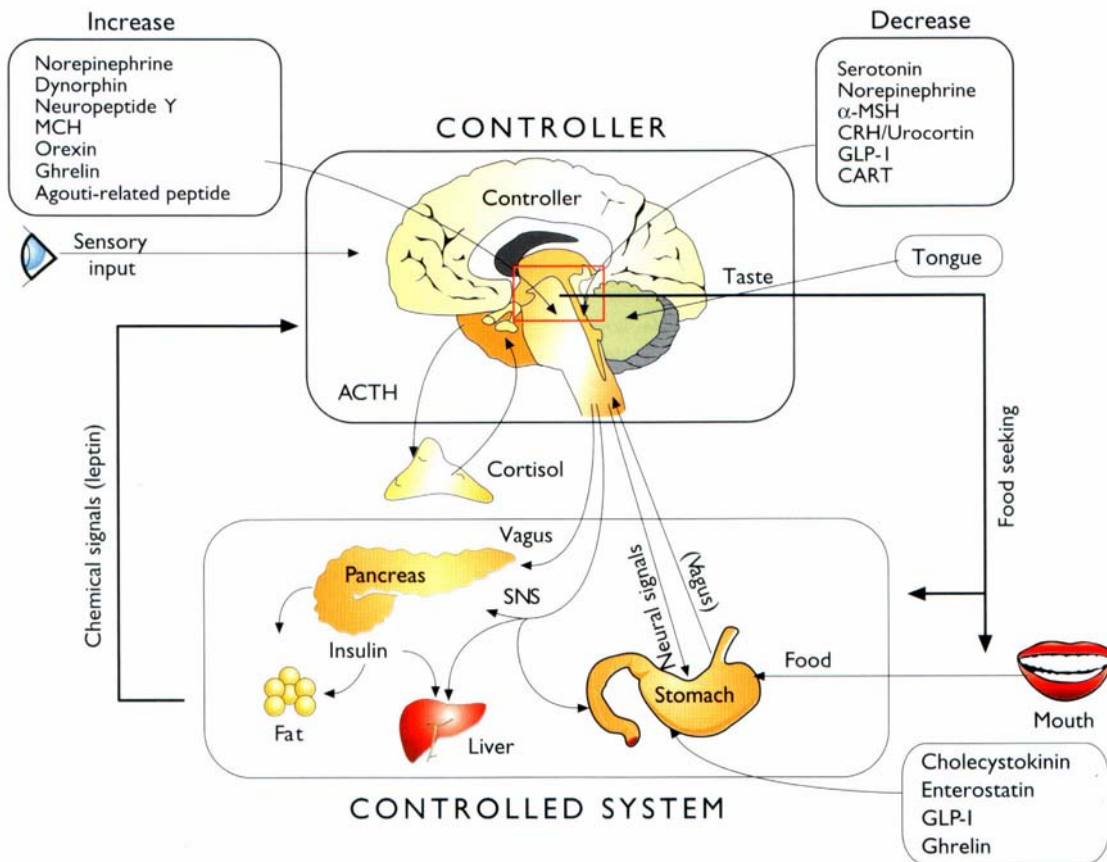


Figura 1. Esquema general dels mecanismes de control de la ingesta. El sistema de regulació disposa d'un controlador (hipotàlem) que rep senyals sensorials, senyals químics o hormonals (leptina i insulina) i pèptids intestinals o neuropèptids que incrementen/disminueixen la ingesta en relació a l'estat metabòlic del sistema controlat (TAB, fetge, pàncrees i estómac). Els òrgans del sistema controlat reben també ordres del controlador i responen augmentant/disminuint el metabolisme. La ingesta d'aliment intervé també en la regulació mitjançant els efectes dels senyals sobre l'absorció i la motilitat gastrointestinal. (George A. Bray, An Atlas of obesity and weight control. The Parthenon Publishing Group, USA, 2003)

A nivell cerebral, els sistemes neuronals que regulen la ingesta i el consum energètic, detecten i responen als canvis hormonals i als senyals que li arriben provinents del cervell, la circulació perifèrica i el tracte gastrointestinal que transmeten informació sobre les reserves energètiques de l'organisme. El sistema nerviós central respon a aquests canvis modulant l'activitat dels sistemes neuronals efectors que controlen la ingesta i el consum energètic i que consisteixen en neurotransmissors (en general de naturalesa peptídica) i vies axonals cerebrals. Les principals regions implicades són l'hipotàlem (nucli arquejat particularment) i a nivell del complex vagal dorsal (Schwartz i col, 2000).

### 1.2.1.1. Molècules implicades en el control gastrointestinal de la ingesta

A nivell del tracte gastrointestinal, diverses molècules peptídiques i hormones intervenen en la regulació del buidat gàstric que provoca la sensació de sacietat, estimulant neurones hipotalàmiques directament o bé a nivell de sistema nerviós simpàtic.

#### 1.2.1.1.1. Ghrelina

La ghrelina és un pèptid de 28 aminoàcids, obtingut pel processat del seu precursor preproghrelina, que es sintetitza principalment a les glàndules oxíntiques de l'estómac i s'allibera a la circulació (Sakata i col, 2002). La seva forma activa es troba acetilada per l'àcid n-octanoic, transformació que li permet unir-se al seu receptor (Otto i col, 2005). S'ha identificat com el lligand endogen del receptor de la segretagoga de la hormona del creixement (GHS-R) i estimulant l'alliberament de l'hormona de creixement (GH), que s'expressa principalment en hipotàlem i altres àrees del cervell (Wynne i col, 2005). Els nivells de ghrelina en humans són alts en els períodes de dejuni i baixen després de la ingesta (Cummings i col, 2001; Tschop i col, 2001). Té efectes orexigènics tant si s'administra perifèricament com centralment i disminueix la utilització de lípids en ratolins (Tschop i col, 2000; Wortley i col, 2004). Els nivells de ghrelina cauen en resposta a la ingesta d'aliment o glucosa, però no per la ingestió d'aigua, per tant la distensió gàstrica no és el seu regulador (Tschop i col, 2000). Els nivells en humans varien amb el ritme circadià juntament amb la leptina, i per tant són alts al matí i baixos a la nit (Cummings i col, 2001). La ghrelina incrementa l'expressió de neuropèptid Y (NPY) al nucli arquejat, estimulant directament neurones hipotalàmiques (Nakazato i col, 2001) i duu a terme accions inhibidores a nivell del nervi vague (Date i col, 2002).

#### 1.2.1.1.2. Pèptid YY

El pèptid YY (PYY) és secretat per les cèl·lules endocrines de l'intestí prim i gruixut i s'allibera a la circulació després de les menjades (Ekblad i Sundler, 2002). Pertany a la família de pèptids PP (com el NPY i el PP). La seva forma activa és el PYY<sub>3-36</sub>. L'administració perifèrica de PYY inhibeix la ingesta. Es secreta com a resposta a la ingesta d'aliment, especialment amb dietes riques en greixos (Lin i Chey, 2003), àcids gàstrics, CCK i sals biliars. De tota manera, l'alliberació de PYY es dona abans que els nutrients arribin a les cèl·lules del tracte distal, per tant la seva secreció ha de respondre a un reflex neural a més del contacte directe amb els nutrients (Fu-Cheng i col, 1997). S'uneix amb alta afinitat a les proteïnes G lligades als receptors Y1, Y2 i Y5. PYY incrementa l'absorció de fluids i electròlits

a l'ili, inhibeix les secrecions de l'estómac el pàncrees, i retarda el buidat de l'estómac i l'intestí gruixut. (Neary i col, 2004)

### 1.2.1.1.3. Coleocistoquinina

La coleocistoquinina (CCK) va ser la primera hormona intestinal descrita inhibidora de la ingesta. Es produeix a l'intestí prim com a resposta als greixos i proteïnes de la dieta (Scharf i Ahima, 2004). La CCK inhibeix la ingesta a través de receptors CCK<sub>A</sub>, que s'expressen al nervi vague, pàncrees, neurones entèriques, i algunes regions dels cervell. La CCK coordina la digestió estimulants les secrecions d'enzims pancreàtics, augmentant la motilitat intestinal i inhibint el buidat gàstric (Liddle i col, 1985; Moran i Schwartz, 1994). La CCK funciona també com a neurotransmissor al cervell en diversos processos tals com el comportament, la memòria, ansietat o la sacietat (Crawley i Corwin, 1994). L'administració de CCK, tant en animals com en humans, inhibeix la ingesta reduint-ne la duració i la quantitat d'aliment ingerit (Gibbs i col, 1973; Kissileff i col, 1981), un efecte que es veu estimulat per la distensió gàstrica (Kissileff i col, 2003). Tot i que el seu efecte sobre la ingesta és molt ràpid, la seva duració és també molt curta, donat que la vida mitja de la CCK és de tan sols 1-2 minuts. La CCK exerceix els seus efectes unint-se a receptors CCK<sub>A</sub> i CCK<sub>B</sub>; tots dos receptors units a proteïnes G. Aquests receptors es troben principalment distribuïts al cervell en diferents àrees, però també es poden trobar en el nervi vague aferent, en neurones entèriques (CCK<sub>A</sub>) o inclús a l'estómac (CCK<sub>B</sub>) (Moran i col, 1986; Moran i col, 1990; Wank i col, 1992).

### 1.2.1.1.4. Pèptid glucagó-like

El pèptid glucagó-like (*GLP*) cosecretat amb PYY en resposta a la presència de nutrients a l'intestí (Herrmann i col, 1995). Es sintetiza a partir del trencament del pro-glucagó, que pot donar lloc a diferents productes en funció del teixit. Inhibeix la ingesta de nutrients (Turton i col, 1996) i potencia la secreció de la insulina durant la ingesta; produeix sacietat, inhibeix el buidat gàstric, i com a conseqüència disminueix el pes corporal (Meeran i col, 1999).

Moltes altres molècules s'han considerat que intervenen en el control de la ingesta, així com el polipèptid insulinoatròpic dependent d'insulina (GIP), el pèptid alliberador de gastrina (GRP), l'amilina (IAPP), la procolipasa, etc.

### 1.2.1.2. Hormones implicades en el control a mig i llarg termini de la ingesta

En el control a mig i llarg termini hi ha dues hormones principals implicades: la leptina i la insulina.

#### 1.2.1.2.1. Leptina

La leptina és una hormona produïda majoritàriament al teixit adipós que actua com a senyal de sacietat participant en la regulació del pes corporal. El 1994 es va clonar el gen *Lep* (ob) que codifica per la leptina (Zhang i col, 1994), i dos anys després es va localitzar el gen *LepR* (db) que codifica pel seu receptor (Chen i col, 1996). Es va observar com la administració de leptina a ratolins obesos ob/ob els produïa una pèrdua de pes corporal (Campfield i col 1995), mentre que els ratolins db/db, també obesos, eren insensibles a la leptina (Campfield i col 1995). Això era degut a que els primers són portadors d'una mutació per la qual no expressen leptina, mentre que els altres en canvi, tenen una mutació a nivell del receptor de la insulina.

La leptina és una proteïna de 16 kDa produïda principalment en teixit adipós, però també s'ha localitzat la seva síntesi en altres teixits perifèrics (estómac, placenta, múscul...). És secretada a la circulació perifèrica i actua a nivell hipotalàmic com a molècula senyalitzadora de la quantitat de reserves del teixit adipós, pel que se la considera una senyal involucrada en el control del pes corporal i del balanç energètic (Schwartz i col, 2000). Tot i això, s'ha comprovat que en humans hi ha molt pocs casos d'obesitat causats per defectes en la senyalització de la leptina (ja sigui a nivell de receptor o de expressió de leptina) (Montague i col, 1997). Tot el contrari del que es pensava, els individus obesos tenen nivells més elevats de leptina circulant, ja que tenen més teixit adipós (Maffei i col, 1995) i generen resistència a aquesta hormona. Segons semblen indicar les dades, els efectes biològics de la leptina són més pronunciats quan els nivells circulants són baixos. Així, una reducció calòrica de la dieta, produeix uns nivells baixos de leptina que es relacionen amb la sensació de gana que es genera. Per tant, la leptina podria tenir uns efectes a mig termini regulant la ingesta, particularment en situacions de dèficit energètic. De fet, s'ha proposat que el seu paper principal en la regulació de la ingesta es dona en situació de dejuni (Ahima i Flier, 2000).

Els nivell circulants de leptina estan íntimament correlacionats amb l'IMC (Maffei i col, 1995) i són un reflex dels nivells de massa grassa de l'organisme. A més, s'ha demostrat també que existeix una correlació entre l'expressió del gen *lep* i el contingut lipídic dels adipòcits així com amb la seva mida (Maffei i col, 1995). A més els nivells de leptina en

plasma disminueixen amb el dejuni, amb la pèrdua de pes (Maffei i col, 1995), i incrementen en períodes de sobrealimentació (Friedman, 1997).

Les accions de la leptina a nivell de sistema nerviós central són possibles perquè travessa la barrera hematoencefàlica (Banks i col, 1996). Tant les neurones productores de Neuropeptid Y (NPY) i Agouti related Protein (AgRP) (pèptids orexigènics) com les productores de proopiomelanocortina (POMC) i transcrit regulador de cocaïna i amfetamina (CART) (pèptids anorexigènics), expressen receptors de leptina (Cheung i col, 1997) i responen a l'hormona en sentits oposats. Així, un increment de leptina en plasma produeix una inhibició dels gens que codifiquen per NPY i AGRP i afavoreix l'expressió i alliberament de POMC/CART, produint globalment, una disminució de la ingesta. Nivells baixos de leptina produeixen els efectes contraris (Schwartz i col, 2000).

### 1.2.1.2.2. *Insulina*

Des de fa més de trenta anys la insulina s'ha considerat una hormona implicada en el control a llarg termini de la ingesta, el balanç energètic i l'adipositat corporal (Woods i col, 1974). De fet, la insulina va ser la primera senyal d'adipositat proposada (Schwartz i col, 1992). Hi ha nombroses evidències que ens porten a establir aquesta relació entre la insulina i la ingesta o el pes corporal. Una de les més directes és que els nivells plasmàtics de insulina varien directament en relació amb els canvis en l'adipositat (Bagdade i col, 1967). A més un balanç energètic positiu, i per tant, un guany de pes corporal, incrementa la insulina plasmàtica de manera proporcional a l'augment de la massa grassa; mentre que el contrari succeeix en el cas oposat (Woods i col, 1974). Però alhora, els nivells d'insulina circulants es veuen directament afectats per la ingesta energètica recent. Així doncs, la ingesta estimula la secreció d'insulina al pàncrees degut a uns efectes coordinats entre els nervis parasimpàtics que innerven el pàncrees i l'estimulació d'hormones gastrointestinals (GIP i GLP-1) (Alessio i col., 2001).

La insulina travessa la barrera hematoencefàlica i arriba al cervell gràcies a l'acció d'un receptor saturable a altes concentracions (Baura i col, 1993). De fet s'ha demostrat que no hi ha síntesi d'insulina al cervell o bé és mínima (Woods i col, 2003). Un cop al cervell la insulina exercirà els seus efectes anorexigènics. Així, la administració intracerebroventricular (ICV) o hipotalàmica d'insulina produeix una inhibició de la ingesta i més tard una reducció del pes corporal tant en rosegadors (McGowan i col, 1990; Schwartz i col, 1992) com en primats (Woods i col, 1979). En canvi la administració d'anticossos contra la insulina a l'hipotàlem ventromedial en rates, produeix un increment de la ingesta i el pes corporal



(McGowan i col, 1990). A més, ratolins amb una supressió genètica dels receptors neurals de insulina són hiperfàgics i obesos (Sipols i col, 1995).

Els receptors d'insulina es troben distribuïts per tot el cervell, amb una concentració més alta en les zones del bulb olfactori i l'hipotàlem (Marks i col, 1990). Dins l'hipotàlem es troben particularment expressats en les cèl·lules del nucli arquejat (ARC) productores de NPY i POMC (Woods i Steeley, 2001). D'aquesta manera, la insulina, un cop travessa la barrera hematoencefàlica, interacciona amb els receptors d'aquestes neurones implicades en la regulació del balanç energètic, provocant canvis en la ingesta i el pes corporal. Així la administració ICV d'insulina en animals dejunats evita la baixada dels nivells d'expressió de NPY en l'ARC provocada pel dejuni (amb baixos nivells d'insulina circulant) (Schwartz i col, 1992b; Sipols i col, 1995). D'altra banda, la insulina activa el sistema hipotalàmic de les melanocortines, promovent una disminució de la ingesta i del pes corporal (Benoit i col, 2002; Niswender i col, 2004). En aquest cas, la administració ICV d'insulina estimula l'expressió de POMC en l'ARC, que serà el precursor de l'hormona estimuladora de melanòcits  $\alpha$  ( $\alpha$ -MSH) (Benoit i col, 2002).

### 1.2.1.3. Neuropèptids implicats en el control hipotalàmic de la ingesta

En el cervell, múltiples neuropèptids s'encarreguen de transmetre senyals moduladores de la ingesta que informen directament els nuclis hipotalàmics. Els principals senyals orexigènics són el Neuropèptid Y (NPY), la proteïna relacionada amb Agouti (AgRP), galanina (GAL), la hormona concentradora de melanina (MCH) i les orexines. Els factors anorexigènics més rellevants són la proopiomelanocortina (POMC) i el transcrit regulador de cocaïna i amfetamina (CART).

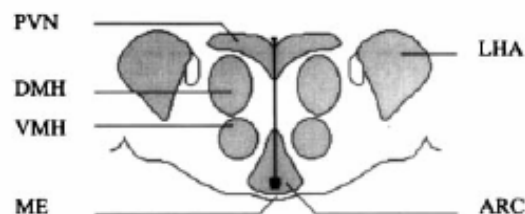


Figura 2. Anatomia de l'hipotàlem de rata. Secció coronal de l'hipotàlem que mostra les posicions relatives del nucli arquejat (ARC), l'hipotàlem ventromedial (VMH), l'hipotàlem dorsomedial (DMH), el nucli paraventricular (PVN) i l'àrea de l'hipotàlem lateral (LHA) respecte d'ells mateixos al cervell (Williams i col, 2001).

### 1.2.1.3.1. *Neuropèptids orexigènics*

#### 1.2.1.3.1.1. Neuropèptid Y

El Neuropèptid Y (NPY) és un neuropèptid de 36 aminoàcids considerat un dels agents orexigènics més potents. És un dels neurotransmissors més abundants al cervell (Allen i col, 1983) i els seus nivells hipotalàmics són un indicador de l'estat nutricional de l'organisme, propietat que el caracteritza com un regulador de la homeòstasi energètica a llarg termini. Els nivells de NPY i del seu RNAm són alts durant els períodes de dejuni i disminueixen després de la ingesta, tal com és propi d'una molècula amb funcions orexigèniques (Sanacora i col, 1990; Swart i col, 2002). La principal regió cerebral que expressa NPY és el nucli ARC (Morris, 1989), les neurones del qual es projecten al PVN (Bai i col, 1985). Una única administració ICV estimula la ingesta en rosegadors, i repetides injeccions ICV de NPY al PVN causen hiperfàgia mantinguda i obesitat (Stanley i col, 1986; Zarjevski i col, 1993). L'administració central de NPY provoca també una reducció del consum energètic com a conseqüència d'una reducció de la termogènesi en TAM (Billington i col, 1991), un bloqueig de l'activitat simpàtica (Egawa i col, 1991) i una inhibició de l'eix tiroïdal (Fekete i col, 2002). A més, també s'afecten els nivells d'algunes hormones; així, tant els nivells basals d'insulina plasmàtica com els nivells de cortisol matinal, es veuen incrementats considerablement (Zarjevski i col, 1993), independentment de l'increment de la ingesta.

Tot i els potents efectes orexigènics de NPY, ratolins *knock-out* per aquest gen no pateixen obesitat ni adipositat anormal (Thorsell i Heiling, 2002), tot i que sí redueixen la quantitat de ingesta induïda pel dejuni (Bannon i col, 2000). Aquest fenomen s'explica per l'existència de mecanismes compensatoris que l'organisme activa per tal d'evitar un fracàs de l'homeòstasi energètica. Així doncs el sistema disposa de vies orexigèniques redundants o alternatives, tals com les vies de senyalització per AgRP (Marsh i col, 1999).

El NPY forma part de la família de pèptids de plegament PP (del polipèptid pancreàtic), tal com el PP o el PYY. Els seus receptors són, per tant, receptors acoblats a proteïnes G, i s'enumeren del Y<sub>1</sub>-Y<sub>6</sub>. De Y<sub>1</sub>-Y<sub>5</sub> es troben en cervell de rata, però el receptor Y<sub>6</sub> no es troba en rata i és inactiu en humans (Inui, 1999). Els receptors Y<sub>1</sub>, Y<sub>2</sub>, Y<sub>4</sub> i Y<sub>5</sub> són els responsables dels efectes orexigènics del NPY, i han estat clonats en hipotàlem. Així, els efectes de NPY semblen ser conseqüència d'una combinació de l'acció de receptors, més que no pas d'un sol d'ells (Wynne i col, 2005).

#### 1.2.1.3.1.2. Agouti-related protein

Agouti-related protein (AgRP) és un pèptid que s'expressa principalment en l'ARC (Hahn i col, 1998) en neurones que també expressen NPY (Broberger i col, 1998). Intervé en el sistema central de les melanocortines, així com l'hormona estimuladora de melanòcits  $\alpha$  ( $\alpha$ -MSH), un agonista dels receptors de melanocortines 3 i 4 (MC3-R i MC4-R). L'AgRP, per contra, és un antagonista competitiu d'aquests receptors (Okumura i col, 2000), que no només antagonitza els efectes de  $\alpha$ -MSH sinó que és capaç de suprimir l'activitat basal de MC4-R, convertint-se així en un agonista invers (Haskell-Luevano i Monck, 2001). Aquest pèptid va ser descobert per la seva homologia a la proteïna agouti, proteïna de la pell que regula la pigmentació en ratolins, tot i que malgrat es tracti de proteïnes pràcticament idèntiques, no comparteixen els mateixos receptors (Okumura i col, 2000). AgRP i NPY mantenen una relació funcional estreta i la seva expressió es troba modulada de manera similar en diferents condicions fisiològiques (Mizuno i Mobbs, 1999; Ziotopoulou i col, 2000). Aquest fet es fa evident en casos de balanç energètic negatiu (restricció energètica) o de demanda energètica elevada (lactància), en què els nivells de leptina i insulina són baixos i els de ghrelina i corticosterona alts, estimulants així AgRP i NPY alhora (Mizuno i Mobbs, 1999; Chen i col, 1999). Injeccions centrals agudes de AgRP provoquen efectes molt potents sobre la ingesta que es mantenen fins als 6 dies després (Rossi i col, 1998), mostrant una durada molt superior a la del NPY. L'administració crònica, igual que NPY, incrementa la ingesta diària i disminueix el consum d'oxigen, induint així una acumulació de greix corporal i dels nivells de leptina (Small i col, 2003). Els efectes d'AgRP i NPY són de caràcter redundants entre ells, en tots dos casos assegurant la ingesta energètica durant els períodes de manca d'aliment per evitar un balanç negatiu continuat (Leibowitz i Wortley, 2004).

#### 1.2.1.3.1.3. Galanina

Galanina (GAL) és un pèptid orexigènic de 29 aminoàcids que va ser aïllat en intestí prim per primera vegada tot i que es troba distribuït per tot l'hipotàlem (Tatemoto, i col, 1983). Les neurones on s'expressa més la GAL són les dels nuclis PVN, LHA i l'ARC, que projecten a totes les regions de l'hipotàlem, on es troben els receptors de galanina GALR1 i GALR2 (Gundlach i col, 2001). Tot i tenir efectes estimuladors de la gana, la via de funcionament de la GAL és diferent del NPY. A nivell d'estimulació hormonal, tant la GAL com el NPY estan estimulats per l'acció de la insulina (Wang i Leibowitz, 1997); la leptina, en canvi, inhibeix fortament l'expressió de NPY mentre que té pocs efectes sobre l'expressió de la GAL, observant-se només una reducció suau de la seva expressió en el cas del PVN (Cheung i col, 2001). Aquesta resposta diferent a la leptina es pot explicar pel fet que les neurones productores de GAL no disposen de gran quantitat de receptors de leptina

(Cheung i col, 2001). La restricció energètica disminueix els nivells de leptina i incrementa l'expressió de NPY, mentre que els nivells d'expressió de GAL no s'alteren o tendeixen a disminuir (Brady i col, 1990). A més, la ingesta induïda per la GAL és menys marcada i de durada més curta que la induïda pel NPY (Kalra i col, 1999). Quan s'administra GAL en el PVN s'observa un augment específic de la ingestió de greixos (Tempel i col, 1988). A més, la GAL s'estimula per una dieta rica en greixos i un increment en els lípids circulants. Es pensa que els efectes de la GAL tenen la funció de restablir el balanç glucídic en una situació metabòlica en que la ingesta de glúcids i el seu metabolisme són mínims. Així, la GAL incrementa el metabolisme glucídic al múscul i disminueix la capacitat de metabolització de lípids (Leibowitz i Wortley, 2004).

#### 1.2.1.3.1.4. Hormona concentradora de melanina

L'hormona concentradora de melanina (MCH) es sintetitza en les neurones del LHA i la zona incerta (nucli subtalàmic de funció incerta), que projecten extensament en el sistema nerviós central (Skofitsch i col, 1985; Bittencourt i col, 1993). El pèptid MCH actua mitjançant un receptor específic acoblat a proteïnes G (MCHR1) que s'expressa extensament en tot el cervell; concretament en hipotàlem s'ha trobat en els nuclis VMN i ARC. Tot i que la funció específica d'aquest pèptid roman encara per descobrir, se li coneix una implicació rellevant en el control del pes corporal (Leibowitz i Wortley, 2004). Estudis d'expressió gènica de MCH mostren semblances i diferències respecte dels pèptids orexigènics de l'ARC. Així, l'MCH coincideix amb el NPY i l'AgRP en ser activat durant els períodes de balanç energètic negatiu i d'alta demanda energètica; mentre que difereix d'aquests en funcionar independentment de leptina i en no respondre a senyals nutricionals de baixa disponibilitat i utilització de glucosa. També difereix en la resposta generada, induint pocs efectes a nivell de ingesta que són compensats pels seus potents efectes anabòlics sobre la reducció de la despesa energètica, la oxidació de lípids i la termogènesi (Leibowitz i Wortley, 2004).

#### 1.2.1.3.1.5. Orexines

Les orexines, també conegudes com hipocretines, són uns neuropèptids identificats recentment (de Lecea i col, 1998; Sakurai i col, 1998). Van ser descobertes per dos autors simultàniament mitjançant diferents tècniques, amb seqüències d'aminoàcids idèntiques, fet que va causar que fóssin conegudes per dos noms diferents: les orexines o les hipocretines. Codificats pel mateix gen es troben dos neuropèptids diferents: orexina A (ORX-A) o hipocretina-1 i orexina B (ORX-B) o hipocretina-2. Comparteixen un 40% d'homologia, i s'han localitzat principalment en el LH, coexistent amb les neurones productores de MCH

(Broberger i col, 1998). Les neurones que expressen orexines projecten cap a l'ARC i el PVN, a més d'altres zones del cervell (Nambu col, 1999). La injecció ICV d'orexines estimula la ingesta de manera dosi-dependent, amb efectes més potents de la ORX-A que la ORX-B (Sakurai i col, 1998), però menys efectives que el NPY. S'han descrit dos receptors d'orexines, Ox-1 i Ox-2, amb un patró d'expressió similar a la dels axons orexíntics (Hervieu i col, 2001). Igual com les neurones de NPY/AgRP de l'ARC, les neurones productores d'orexina s'estimulen amb el dejuni i el balanç energètic negatiu. D'altra banda, també s'estimulen amb la ingesta de greixos i els lípids circulants, igual com ho fan les neurones productores de GAL (Leibowitz i Wortley, 2004).

### **1.2.1.3.2. Neuropèptids anorexigènics**

#### **1.2.1.3.2.1. Pro-opiomelanocortina**

Dins el sistema central de les melanocortines trobem el precursor anomenat pro-opiomelanocortina (POMC), una proteïna sintetitzada al nucli ARC i a la hipòfisi anterior. Com a conseqüència de l'acció d'una convertasa, la pro-hormona POMC, dóna lloc a diversos pèptids diferents. El producte predominant de POMC secretat a la hipòfisi és l'ACTH, molècula que s'uneix al receptor de melanocortines 2 (MC2-R) localitzat al còrtex adrenal, estimulant així l'alliberació i la síntesi de glucocorticoides. En el nucli ARC, l'ACTH és processat per tal de produir  $\alpha$ -MSH, que en aquest cas serà l'agonista principal dels receptors de melanocortines que es troben al cervell (MC3-R i MC4-R) (Schiöth i col, 1997). L'administració ICV d' $\alpha$ -MSH en rates provoca una reducció de la ingesta de manera dependent de dosi (Shimizu i col, 1989), i ratolins deficientes en POMC desenvolupen hiperfàgia i obesitat de la mateixa manera que ho fan els ratolins deficientes en MC4-R (Yaswen i col, 1999). Els nivells de l'expressió de POMC es troben estimulats en condicions de balanç energètic positiu, és a dir en ingestes calòriques excessives, elevats valors de leptina i reduïts de ghrelina, però això no passa en consumir grans quantitats de greixos. S'ha postulat un mecanisme de funcionament de les melanocortines segons el qual l' $\alpha$ -MSH s'uniria a MC4-R per activar-lo i disminuir la ingesta (Rossi i col, 1998); mentre que l'AgRP competiria per aquest receptor amb  $\alpha$ -MSH, estimulant la ingesta (Graham i col, 1997). Durant els períodes de balanç energètic negatiu, s'indueix la disminució de l'expressió del gen de la POMC en l'ARC (Mizuno i col, 1998), i augmenta l'expressió d'AgRP (Mizuno i Mobbs, 1999), de manera que AgRP competirà amb  $\alpha$ -MSH i reduirà les seves accions sobre el receptor MC4-R. En canvi, en condicions de balanç energètic positiu, un increment en l'alliberació de  $\alpha$ -MSH provoca una atenuació de la ingesta d'aliment i un increment de l'activitat simpàtica responsable de promoure efectes metabòlics que restringeixen el guany de pes corporal durant l'excés d'ingesta energètica (Leibowitz i Wortley, 2004).

### 1.2.1.3.2.2. Trànscripció regulada per cocaïna i amfetamina

Un dels darrers neuropèptids descoberts ha estat el transcrició regulada per cocaïna i amfetamina (CART), identificat en cervell de mamífers (Douglass i Daoud, 1996; Couceyro i col, 1997). CART coexpressa amb POMC en l'ARC (Elias i col, 1998), però també s'expressa en neurones del LH i el PVN entre d'altres (Couceyro i col, 1997) que projecten arreu de l'hipotàlem. Els nivells de RNAm de CART en animals dejunats disminueixen acusadament en el ARC, mentre que l'administració de leptina a ratolins ob/ob els estimula l'expressió de CART (Kristensen i col, 1998). La relació entre leptina i CART sembla ser força estreta, donat que les mateixes neurones de l'ARC que expressen CART posseeixen receptors de leptina (Elias i col, 1998). Els nivells hipotalàmics de CART també es veuen incrementats per acció de la insulina o els glucocorticoides (Li i col, 2002; Vrang i col, 2003). D'altra banda els nivells de CART semblen també estar afectats pel consum de greixos i l'increment dels lípids circulants. D'aquesta manera, una dieta hiperlipídica o una situació d'obesitat, incrementen els nivells de CART en relació a una dieta pobre en lípids o un individu amb normopès (Wortley i col, 2004).

Administracions agudes ICV de CART redueixen la ingesta i la realimentació induïda per NPY (Volkoff i Peter, 2000). El tractament crònic ICV no només implica una disminució de la ingesta sinó que també redueix el pes corporal, tant en animals obesos com amb normopès (Larsen i col, 2000). Cal dir que pot produir dificultats motores (Abbot i col, 2001) i aversió a alguns aliments (Aja i col, 2002), arribant a casos de supressió total de la ingesta. L'administració central també produeix efectes inhibidors sobre la secreció gàstrica i el buidat gàstric (Okumura i col, 2000), incrementa els nivells d'àcids grassos circulants (Wortley i col, 2004) i estimula la termogènesi en TAM, TAB i múscul (Kong i col, 2003; Wang i col, 2000).

Tot i que s'han fet estudis per trobar el receptor de CART, l'únic que es sap fins al ara és que hi ha un receptor específic per CART del què es coneix el comportament farmacocinètic però encara no s'ha pogut identificar (Vicentic i col, 2005).

### **1.2.2. MECANISMES DE REGULACIÓ DE LA TERMOGÈNESI**

Juntament amb la ingesta, el consum energètic és l'altra component implicat en el manteniment del balanç energètic. Dins el consum energètic podem considerar tres grans fonts: la taxa metabòlica basal, l'activitat física i la termogènesi adaptativa.

La termogènesi adaptativa es defineix com la oxidació ineficient de combustibles per produir calor enlloc d'ATP, i s'activa com a resposta a estímuls ambientals, a una ingesta excessiva o bé a la infecció. Aquesta producció de calor es superposa a la generació de calor

residual inevitable dels processos metabòlics i l'acció muscular de l'organisme. Els principals òrgans responsables de la termogènesi són el múscul esquelètic i el teixit adipós marró (TAM). El múscul esquelètic pot generar calor de manera voluntària (exercici) o involuntària per exposició a baixes temperatures (termogènesi tremolosa). El TAM la termogènesi es pot induir amb la temperatura (termogènesi no tremolosa) i per la dieta (termogènesi induïda per la dieta). També el fetge intervé en la despesa de calor participant en cicles fútils o cicles de substrats que consumeixen ATP, amplifiquen la senyal metabòlica i produeixen calor.

El múscul esquelètic és el principal responsable de la termogènesi involuntària com resposta al fred. Les baixes temperatures obliguen l'organisme a reaccionar ràpidament oxidant qualsevol substrat metabòlic susceptible de ser oxidat. El primer mecanisme que es dispara inicialment és la tremolor, que es produeix quan la musculatura esquelètica es contrau i es relaxa ràpidament quasi alhora. Aquesta contracció muscular no realitza cap treball útil, sinó que tan sols consumeix energia (ATP) que es desprèn en forma de calor.

El múscul i el fetge estan implicats en un dels cicles fútils més coneguts del metabolisme glucídic, el cicle de Cori. El múscul genera ATP per glucòlisi anaeròbica de la glucosa a lactat, que passarà a la circulació i captarà el fetge per transformar-lo a glucosa novament mitjançant la gluconeogènesi i consumint molècules d'ATP més dels que s'han obtingut en múscul. Per tant, aquest cicle té un cost energètic alt i implica un consum energètic que no aporta un benefici net en producte però que dissipa energia en forma de calor.

El teixit adipós marró (TAM) és el principal teixit implicat en la termogènesi adaptativa en rosegadors o en nadons. La proteïna desacobladora 1 (UCP1), que s'expressa específicament en aquest teixit, és capaç de dissipar en forma de calor el gradient de protons generat per l'activitat de la cadena respiratòria, desacoblant així la oxidació de combustible de la síntesi d'ATP (Riquier 2005)

El TAM és un teixit adipós, que a diferència del TAB es troba molt innervat pel sistema nerviós simpàtic i molt vascularitzat (Sell i col, 2004). L'elevat flux sanguini possibilita una ràpida difusió de la calor generada cap a la resta de l'organisme i un bon aport d'oxígen i de substrats susceptibles de ser oxidats pel teixit. El control de la termogènesi mediatitzada per UCP1 es dona per les terminals simpàtiques, que alliberen noradrenalina i estimulen la termogènesi unint-se als receptors  $\alpha$ - i  $\beta$ - adrenèrgics dels adipòcits marrons. El sistema nerviós simpàtic també regula la termogènesi a nivell de transcripció gènica de UCP1, donat que estimula l'activació de la proteïna quinasa A que fosforila i activa a CREBPs, responsables d'afavorir la transcripció del gen de la UCP1. L'expressió d'UCP1 també està regulada per diferents receptors nuclears i cofactors, com el receptor activat de proliferació peroxisomal (PPAR $\gamma$ ) o el seu coactivador (PGC-1) (Lowell i Spiegelman, 2000).

Diferents situacions fisiològiques modulen l'activitat simpàtica del TAM. La termogènesi i l'expressió de UCP1 incrementen durant una exposició crònica al fred o una dieta rica en greixos, en el primer dels casos per tal de produir calor mantenir la temperatura corporal, i en el segon per regular el pes corporal (Rothwell i Stock, 1983).

El 1997 es van descobrir noves proteïnes mitocondrials (UCP2 i UCP3), que per la seva homologia amb UCP1 podrien ser responsables de la termogènesi adaptativa en els teixits en què s'expressen. La UCP2 s'expressa en molts teixits mentre que la UCP3 només s'expressa en TAM i múscul esquelètic (Ricquier i Bouillaud, 2000).



## 2. OLEAT D'ESTRONA

### 2.1. L'OLEAT D'ESTRONA (OE) COM A SENYAL DE REGULACIÓ DEL PES CORPORAL : NOVA TERÀPIA PER L'OBESITAT

S'han postulat moltes hipòtesis que podrien ser vàlides per explicar el mecanisme que regula el pes corporal. Una de les teories més àmpliament acceptada és la lipostàtica (Kennedy, 1953) en la que es considera el nivell de reserva lipídica de l'organisme com la variable mesurada, de manera que qualsevol desviació del nivell òptim, produeix un canvi compensatori. Segons aquest model el sistema disposa d'un mecanisme de reconeixement de massa grassa que informa els centres de control del pes corporal del cervell de la quantitat de reserves grasses que té l'organisme per tal de mantenir-ne l'homeòstasi. Amb aquesta informació els centres hipotalàmics regularien la ingesta, la termogènesi i l'ambient hormonal per tal de disminuir o augmentar la quantitat de reserves grasses de l'organisme. Aquest sistema requereix de l'existència d'un "senyal" (o lipostat) que es sintetitzi o alliberi en proporció a la massa grassa, que sigui capaç de travessar fàcilment la barrera hematoencefàlica i que tingui una vida mitja prou llarga per desencadenar efectes a llarg termini. Podríem descartar ràpidament les proteïnes per tenir una vida mitja curta i per no travessar fàcilment la barrera hematoencefàlica. Les molècules molt petites, així com el glicerol, la glucosa, els aminoàcids, etc. estan modulats per l'estat metabòlic i no podrien dur a terme efectes a llarg termini.

Les hormones esteroidees podrien ser perfectes candidates per les seves característiques d'alta estabilitat i alta lipofília (capacitat de penetració). Alguns d'ells es sintetitzen i modulen a nivell cerebral, com els neuroesteroides (Belelli i col, 2005), i els seus efectes poden ser a llarg termini gràcies a l'existència de receptors nuclears d'esteroides (Walters, 1985), molts d'ells receptors orfes dels que encara no es coneix la funció ni el lligand (Enmark i col, 1996; Soontjens i col, 1996). Moltes hormones esteroidees tenen efectes sobre el pes corporal, especialment els glucocorticoides, implicats en el mecanisme de contrarregulació i protecció de la massa gassa (Björntorp, 1995). Els estrògens, en canvi, tenen un efecte aprimador i són activadors de la termogènesi (Dubuc, 1985). Els andrògens contribueixen a la modificació de la distribució dels dipòsits de greix a l'organisme (Gray i col., 1979). Altes dosis de deshidroepiandrosterona (DHEA) en rosegadors provoquen una pèrdua de pes corporal (Cleary i col, 1986), tot i que no succeeix en humans (Usiskin i col, 1990). La progesterona, pel contrari potencia les reserves grasses durant la gestació(). Tots aquests efectes ens indueixen a pensar que el conjunt de les hormones esteroidees poden tenir un paper significatiu en el control del pes corporal (Remesar i col, 1993).

Molts d'aquests efectes impliquen directament l'adipòcit (Cooke i col, 2004), i és que el teixit adipós té una gran capacitat de síntesi d'estrògens, degut a una alta activitat aromataza (Siiteri, 1987). Això explica els alts nivells circulants d'estrone en obesos (Feher i col, 1982), que serien un indicador de la quantitat de teixit adipós que tenen. La síntesi d'estrone en teixit adipós es dona tant en dones com en homes, i en canvi són molt pocs els casos de feminització d'homes obesos. Així doncs, sembla que l'estrone no ha de perquè tenir només un paper estrogènic a l'organisme, sinó que potser també intervé en d'altres mecanismes.

Aquestes van ser les raons per les quals el nostre grup d'investigació va pensar en l'estrone com a possible senyal del ponderostat, però ràpidament es va descartar en veure que tenia efectes clarament anabòlics (Lobo i col, 1993), afavorint la deposició de greixos.

La majoria de les hormones esteroidees que es troben al teixit adipós estan esterificades amb àcids grassos. Es pensa que aquesta pot ser una forma d'emmagatzematge per tal de poder, així, ser alliberades a llarg termini. Es va plantejar la possibilitat que l'estrone es trobés esterificada i viatgés en sang unida a lipoproteïnes, principalment d'alta densitat (HDL), per la seva capacitat de transportar el colesterol dels teixits perifèrics fins al fetge. Es va pensar que aquest mitjà de transport podia ser ideal per una molècula tant lipòfila i estable com un ester d'estrone. Com a àcid gras es va triar l'àcid oleic per ser el majoritari en teixit adipós de rata (Esteve i col, 1992). Es va sintetitzar, doncs, l'oleat d'estrone (OE) (Sanchis i col, 1996) i la sorpresa va ser quan es va veure els efectes d'aquesta hormona sobre el pes corporal dels animals tractats. La marcada disminució de pes corporal sense efectes secundaris aparents va semblar màgica, i d'aquí s'esdevingué el nom de "Merlin" pel que es van conèixer inicialment les seves preparacions i compostos.

L'estudi de l'OE com a molècula apimadora es basa doncs, en la hipòtesi que la senyal del ponderostat encarregada d'informar el sistema nerviós central de la quantitat de reserves grasses del teixit adipós sigui l'OE. Amb aquesta hipòtesi de base, s'han realitzat al llarg dels últims 10 anys nombrosos experiments amb animals d'investigació (rates i ratolins) per tal de conèixer quins són els efectes sobre l'organisme del tractament amb OE i esbrinar així quins són els mecanismes d'acció d'aquesta molècula. D'aquesta manera es poden conèixer també els possibles efectes indesitjables que pogués tenir i la correcta administració del fàrmac per tal que el tractament resulti òptim.

S'ha de tenir en compte que actualment l'empresa Manhattan Pharmaceuticals, Inc. està desenvolupant l'OE com una nova teràpia per combatre l'obesitat. En aquest moment els resultats obtinguts en les proves de Fase I del fàrmac confirmen la seguretat i tolerabilitat de l'OE i el preparen per començar les proves de Fase II.

## 2.2. EFECTES DE L'OE

### 2.2.1. EFECTES SOBRE EL PES CORPORAL I EL METABOLISME ENERGÈTIC

L'administració d'OE en animals d'experimentació indueix una disminució del pes corporal deguda a una disminució de la ingesta de l'animal acompanyada d'un manteniment del consum energètic (Sanchis i col, 1996), de manera que aquest és més alt del que correspondria a la ingesta. La diferència entre el consum i la menor ingesta genera un balanç negatiu que és cobert essencialment amb les reserves lipídiques, conservant-se així la proteïna corporal (Balada i col, 1997a).

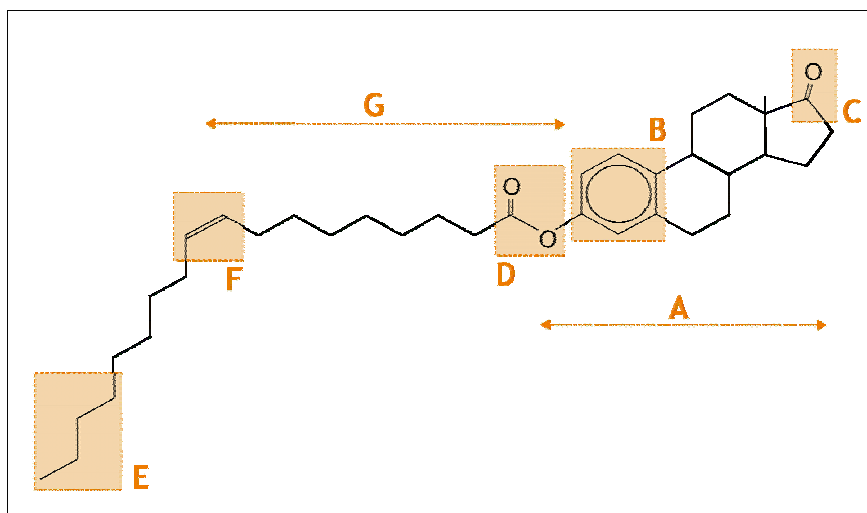


Figura 2. Dominis estructurals que confereixen a l'OE la capacitat de dur a terme els seus efectes sobre el pes corporal i la regulació de la ingesta (Sanchis i col, 1998).

L'OE és un ester d'estrone amb unes característiques estructurals que li confereixen una naturalesa molt lipòfila. Estudis en paral·lel amb diferents anàlegs estructurals de l'OE han demostrat que els seus efectes sobre el pes corporal i la ingesta depenen d'una sèrie de dominis estructurals que són necessaris perquè la molècula dugui a terme la seva funció (Sanchis i col, 1998). Probablement aquestes regions de la molècula siguin necessàries per la interacció amb els seus receptors fisiològics. El nucli esteroide no sembla que intervingui en la interacció amb el receptor, però és necessari per mantenir l'estructura espacial de la molècula (A). L'anell aromàtic de l'estrone (B) i l'enllaç ester (D) són necessaris per la seva efectivitat, així com també ho és que l'anell D tingui una funció oxigenada orientada en el mateix pla que el nucli esteroide (C). La presència d'un àcid gras de cadena llarga és realment imprescindible (E), tot i que també hi ha un límit per aquests llargada. L'efectivitat disminueix en eliminar el doble enllaç en cis de l'àcid gras (F), i la distància entre aquest enllaç i el nucli esteroide també hi sembla ser crítica (G) (Figura 2).

Els efectes de l'OE sobre el pes corporal depenen de la via d'administració, de la dosi administrada i de l'animal d'experimentació. Així doncs, en els primers experiments que es van realitzar en animals d'experimentació, l'OE s'administrava per via intravenosa utilitzant minibombes osmòtiques que s'implantaven subcutàniament a l'esquena de l'animal i que alliberaven OE incorporat en liposomes a la vena cava, amb un flux constant de 5µl/h (Sanchis i col, 1996). Més endavant es va optar per la via d'administració oral mitjançant sonda intragàstrica (Grasa i col, 2001a), per ser una via d'administració menys invasiva, més ràpida i més fàcilment aplicable als humans. En aquest cas l'OE s'administra als animals dissolt en oli de girasol per ser el vehicle estudiat amb que es va observar millor resposta al tractament. També s'ha administrat oralment, com un suplement a una dieta hiperlipídica (Remesar i col, 2000; López-Martí i col, 2000). En aquest cas els animals disposaven d'un pinso hiperlipídic que contenia OE, i per tant la dosi administrada variava en funció de la ingesta. En tots els casos el tractament amb OE produeix un efecte aprimador, però cada via d'administració té les seves característiques particulars.

Estudis dosi-efecte amb OE han demostrat que la pèrdua de massa grassa i d'energia que es produeix tant amb el tractament oral com intravenós és dependent de dosi, i és deguda en part a la pèrdua de gana de l'animal que provoca una ingesta disminuïda també de forma dependent de dosi (Grasa i col, 2001a). La correlació, en el tractament oral, s'estableix en un rang de dosis entre 0.2 i 20 µmols/Kg\*dia. Arrel d'aquests resultats s'estableix la dosi 10 µmols/Kg\*dia com la dosi estàndard amb la que es realitzarà la caracterització dels efectes de l'OE a l'organisme per via oral.

Els efectes sobre el pes corporal amb OE que s'han estudiat en diferents models animals fins a l'actualitat han estat: rates amb normopès de diverses soques (Wistar, Zucker fa/?) i rates obesas genèticament (Zucker fa/fa) (Balada i col, 1997a), rates obesas per hiperfàgia (alimentades amb dieta de cafeteria o pinso hiperlipídic) (Balada i col, 1997b; Remesar i col, 2000) i ratolins obesos genèticament (ob/ob i db/db) (Grasa i col, 2000). També s'han estudiat les diferències de resposta a l'administració d'OE tant en mascles com femelles i s'ha observat que els mascles són més sensibles al tractament i per tant perden més pes que les femelles en les mateixes condicions (Grasa i col, 2001b). Pel què fa als humans, fins fa poc només hi havia dades d'un sol pacient obès voluntari, que es va autoadministrar OE en 10 períodes consecutius de 21 dies, seguits en cada cas de períodes de descans de com a mínim 2 mesos de durada. En aquest cas, també s'observa una clara disminució del pes corporal que arriba a disminuir l'índex de massa corporal en 10 unitats, de forma similar a l'estudiada en animals d'experimentació (Alemany i col, 2003). Les dades obtingudes recentment en els estudis de Fase I ens diuen que pacients obesos tractats

durant una setmana amb OE, experimenten una pèrdua de pes generalitzada, que encara és manifesta passats 28 dies de l'inici del tractament (Tejura i col, 2005)

Quan els animals amb tractament intravenós amb OE es sotmeten a una dieta de cafeteria en la que poden triar entre diferents aliments (galletes amb paté, bacon, plàtan, pinso, aigua i llet ensucrada), la ingesta global disminueix respecte dels controls sense disminuir pràcticament la quantitat de lípids ni proteïna ingerida, és a dir, que el tractament els indueix una pèrdua d'apetència selectiva pels carbohidrats, i en especial pels sucres (Balada i col, 1997b).

El consum d'oxigen i la taxa metabòlica basal dels animals tractats amb OE es manté pràcticament al mateix nivell que la dels animals controls (Sanchis i col, 1997a), i per tant és superior a la requerida per oxidar la quantitat d'aliment ingerit. També sabem que d'altra banda no es produeixen canvis importants en l'expressió de les proteïnes desacobladores (UCPs) en el teixit adipós ni marró ni blanc per efecte de l'oleat d'estrona (Sanchis i col, 1997a; Yubero i col, 2001). Per tant hem de pensar que l'OE manté la termogènesi a nivells més alts dels que hauríem d'esperar pel nivell d'ingesta.

La pèrdua de gana induïda per l'oleat d'estrona és encara un fenomen de difícil comprensió. La ingesta dels animals tractats intravenosament experimenta una davallada progressiva que s'atura entre el dia 4 i 6 del tractament per recuperar en alguns casos els nivells normals d'ingesta ja a dia 10 de l'inici del tractament. Tot i això el pes dels subjectes baixa fins als 10 dies mantenint-se constant la resta del tractament. Un mes després d'aturar el tractament els animals amb normopès mantenen el seu pes per sota del pes inicial, mentre que els obesos recuperen la pendent de creixement dels animals controls, mantenint sempre la diferència de pes deguda al tractament (Adan i col, 1999a).

### **2.2.2. EFECTES SOBRE ELS METABÒLITS PLASMÀTICS**

La disminució de reserves lipídiques causada per l'OE va acompanyada d'una sèrie de canvis a nivell d'alguns dels metabòlits plasmàtics. Aquests canvis s'observen tant en els metabòlits indicadors del metabolisme lipídic com glucídic, ja sigui amb el tractament oral o intravenós.

Està clar que el metabolisme glucídic està influït de manera important per l'administració de l'OE. El tractament intravenós en rates amb normopès no varia espectacularment els nivells de glucèmia però sí que redueix moderadament la insulinèmia (Balada i col, 1997a). Els animals obesos (Zucker fa/fa), en canvi, disminueixen els nivells de glucosa plasmàtica moderadament però redueixen agressivament la insulina que els regula la captació; mentre que alhora, les reserves de glicogen hepàtic augmenten (Adan i col,

1999b). El tractament oral d'OE provoca igualment una davallada en els nivells de glucosa dels animals obesos que no s'observa en els animals amb normopès, disminuint també en tots dos casos la insulina plasmàtica. En aquest cas també el glicogen hepàtic es veu incrementat per efecte del tractament. En definitiva, l'OE normalitza els nivells plasmàtics de glucosa, essent capaç de reduir aquells valors que es trobin per sobre de la normalitat sense produir canvis en els nivells dels animals normoglicèmics. En tots els casos, però, afecta clarament els nivells d'insulina circulant de que disposa l'animal, però, en contra del què s'hauria d'esperar pels canvis en la glucèmia, a més, l'efecte de l'OE sobre la insulina sempre ho és amb major proporció en els animals obesos. Tenint en compte que la rata Zucker fa/fa es caracteritza per la seva obesitat però també per resistència a la insulina, l'OE pot estar actuant sobre el metabolisme glucídic a nivell de corregir la resistència a la insulina, o el que és el mateix, incrementar la sensibilitat a la insulina. D'aquesta manera, els nivells d'insulina plasmàtics es veuen disminuïts degut a la millora de la sensibilitat dels teixits perifèrics a la insulina, és a dir, que amb poca quantitat que se'n secreti al torrent sanguini ja s'aconsegueix baixar els nivells de glucosa sanguínia fins a valors normals. A partir d'aquesta idea es va plantejar l'OE com una possible teràpia per corregir la resistència a la insulina pròpia de la diabetis de tipus 2 o diabetis no insulino-depenent (Grasa i col, 2001b).

L'efecte de l'OE sobre la mobilització dels lípids depèn de la quantitat de reserves lipídiques de què disposa l'animal, que d'altra banda està relacionada també amb l'estat insulínic de l'animal i el seu funcionament. Així doncs, animals amb diabetis de tipus 1 induïda per estreptozotocina, amb un baix contingut lipídic, no poden perdre tanta quantitat de teixit adipós i necessiten mobilitzar proteïna corporal per mantenir la despesa energètica. El model de rata diabètica de tipus 2 Goto-Kakizaki, en canvi, respon al tractament amb OE d'una manera similar a les rates obeses Zucker fa/fa, suggerint doncs, que els efectes de l'OE es veuen limitats per la manca d'insulina plasmàtica (diabetis de tipus 1), mentre que no s'hi veuen per la resistència a la insulina (diabetis de tipus 2) (Diaz-Silva i col, 2003).

D'altra banda, l'OE no només incrementa la sensibilitat a la insulina sinó que també potencia la resposta insulínica a una sobrecàrrega oral de glucosa en rates obeses. La resposta de la insulina a l'arribada de la glucosa, experimenta un fort pic ja a als 10 minuts després de rebre la sobrecàrrega oral, mantenint-se fins al final superiors que els dels animals controls. Els nivells de glucosa dels animals tractats es mantenen per sota dels controls durant una hora (Cabot i col, 2002).

El metabolisme lipídic també és clau per entendre el funcionament de l'OE. Tot i la dràstica mobilització de reserves lipídiques que provoca el tractament, els nivells d'àcids grassos lliures no es veuen afectats, els triacilglicèrids (TAGs) circulants baixen clarament i el colesterol plasmàtic experimenta una dràstica davallada (Grasa i col, 2001b) deguda en gran

part al colesterol provinent de lipoproteïnes d'alta densitat (HDL)(Blay i col, 2002). Aquests resultats es repeteixen en mascles i femelles, i també amb els tractaments realitzats amb dieta hiperlipídica (López-Martí i col, 2000). En el cas de les rates Zucker fa/fa, que manifesten una marcada hiperlipidèmia, el tractament produeix una forta reducció dels lípids plasmàtics (López-Martí i col, 2000), amb la pràctica desaparició dels quilomícra i una marcada normalització dels lípids circulants (Blay i col, 2002). Aquesta caiguda es produeix en paral·lel a un marcat augment de l'activitat lipoproteïna lipasa muscular i plasmàtica i una disminució global de l'activitat lipasa tant en fetge com en teixit adipós (Blay i col, 2002).

La lleu davallada de la urea plasmàtica dels animals tractats, ens indica una disminució de l'oxidació proteica, preservant la proteïna corporal a canvi d'afavorir el catabolisme de lípids (Sanchis i col, 1997b; Grasa i col, 2001a).

L'únic estudi realitzat en humans publicat fins l'actualitat, reflecteix les mateixes tendències observades en els animals d'experimentació. Els paràmetres plasmàtics no experimenten grans variacions degudes al tractament intermitent amb OE, a excepció de la normalització de la glucosa plasmàtica, la tendència a disminuir dels TAGs i el colesterol total, sense que en aquest cas disminueixin els nivells de colesterol HDL (diferència atribuïble al diferent metabolisme lipoproteic entre rata i humà). De la mateixa manera que passa als animals d'experimentació, en l'humà s'observa una caiguda de la insulínèmia. Així doncs, salvant les distàncies, i tenint en compte les poques dades de què es disposa en humans, sembla que l'organisme humà experimenta efectes a nivell de paràmetres plasmàtics, similars als que experimenta la rata (Alemany i col, 2003).

### **2.2.3. EFECTES SOBRE EL TEIXIT ADIPÓS BLANC.**

Els efectes macroscòpics principals de l'OE sobre l'organisme es centren al teixit adipós blanc. La pèrdua de lípid corporal en l'animal sencer segueix una estreta correlació amb la dosi d'OE administrada (Grasa i col, 2001a), i per altra banda els efectes del tractament oral amb OE no només es poden veure a nivell de lípids corporals, sinó més concretament a nivell de teixit adipós de l'animal.

Tots els dipòsits de teixit adipós blanc estudiats en la rata disminueixen el seu pes entre un 20 i un 40 % després del tractament oral durant 10 dies (Remesar i col, 2002). La localització més afectada és el teixit adipós mesentèric i amb poca diferència el cordó retroperitoneal o lumbar. La reducció del seu pes tissular no només és deguda a la pèrdua de massa cel·lular i per tant de reserves grasses, sinó que també es redueix el nombre de cèl·lules del teixit. Així doncs, la localització on més es redueix la massa cel·lular del teixit

adipós és la gluteal i la subcutània, mentre que en el cas del de l'epidídim i el mesentèric són els que més nombre de cèl·lules sacrifiquen amb el tractament (Remesar i col, 2002).

Estudis de microscòpia òptica demostren que els adipòcits procedents de talls histològics de teixit adipós blanc subcutani i periovàric de rates tractades amb OE durant 14 dies per via intravenosa, tenen un volum cel·lular reduït entre un 74-77% respecte dels adipòcits control (Cabot i col, 2000a).

El mecanisme d'acció pel qual l'OE consumeix els dipòsits de reserves grasses pot ser mitjançada en part per vies d'estimulació adrenèrgica, ja que l'expressió dels receptors  $\beta$  adrenèrgics en els teixits adiposos incrementa moderadament. El receptor  $\beta_1$  incrementa la seva expressió en teixit adipós blanc subcutani, el  $\beta_2$  i  $\beta_3$  en periovàric i el  $\beta_3$  en teixit adipós marró. El  $\beta_3$  disminueix en canvi en TAB subcutani per efecte de l'OE (Cabot i col). També, els adipòcits aïllats de teixit adipós blanc periovàric de rates tractades durant 14 dies per via intravenosa, són més sensibles a l'estimulació adrenèrgica causada per una agonista adrenèrgic (isoproterenol), i per tant produeixen més AMPc que els animals controls. Així doncs sembla que el tractament amb OE estimula els mecanismes adrenèrgics si més no incrementant la capacitat de resposta als agents agonistes, desencadenant així una resposta adrenèrgica més potent que donaria lloc a més activitat lipolítica (Cabot i col, 2001).

Està clar doncs que cada localització de teixit adipós es comporta diferent amb el tractament, però en tots els casos la tendència és a disminuir la massa de teixit adipós, ja sigui per efecte de cremar reserves grasses acumulades en estats de bonança metabòlica, o bé reduint la quantitat de cèl·lules capaces d'acumular aquestes reserves més endavant.

El teixit adipós no només és un òrgan diana dels efectes de l'OE sinó que també n'és l'òrgan de síntesi. Estudis *in vitro* demostren com les cèl·lules adiposes en cultiu (3T3-L1) incubades en presència d'estrone lliure incorporen aquesta hormona i passat un temps l'han transformada a OE (Esteve i col, 1999). Així doncs la cèl·lula adiposa té dos punts de regulació de l'acumulació d'OE: a nivell de captació d'estrone lliure com a precursora de la síntesi o bé a nivell de la síntesi pròpia d'OE a partir d'estrone. Aquesta modulació la duen a terme tres hormones molt relacionades amb el metabolisme del teixit adipós blanc: la insulina inhibeix tant la captació d'estrone com la síntesi d'OE, mentre que la leptina i la corticosterona estimulen la síntesi intracel·lular d'OE de manera dosi i temps dependent (Esteve i col, 2001a).



### 2.3. DISTRIBUCIÓ I NIVELLS D'OE.

La major part de l'estronea corporal es troba esterificada en forma d'OE, acumulada sobretot a la massa grassa del teixit adipós blanc, amb nivells d'estronea lliure molt més baixos. Els valors plasmàtics normals d'OE en humans es troben al voltant de 100 nM, mentre que l'estronea lliure presenta valors al voltant de 1nM. L'OE plasmàtica viatja unida a lipoproteïnes, un 50% es troba en HDL i només un 10% en VLDL. Tot i això les concentracions d'OE en les lipoproteïnes són baixes si les comparem amb d'altres molècules lipídiques, però la seva distribució entre les diferents partícules lipoprotèiques suggereix que l'hormona s'allibera amb altres lípids (colesterol, TAGs,...) a mida que la mida de la lipoproteïna es fa més petita. Encara que la concentració d'OE expressada per unitat de volum de plasma és més alta en HDL que en les altres lipoproteïnes plasmàtiques, les molècules d'OE també s'hi troben més disperses (1 molècula d'OE/partícula HDL); i per tant podem pensar les HDL tenen major capacitat de transferir l'OE (Virgili i col, 1999).

Si s'administra una dosi oral d'oleat d'estronea a una rata amb normopès Zucker Fa/? i es fa un seguiment de l'hormona a l'organisme, podem veure com gran part de l'OE que arriba al lumen intestinal és absorbida com a tal, i només una petita part s'absorbeix com estronea lliure. Les dues principals formes d'entrada de l'OE al cos són per transferència intestinal a HDL (majoritàriament 75%) o carregada en QM via limfa. L'OE travessa la paret intestinal i és carregada pràcticament intacta a les lipoproteïnes plasmàtiques (Esteve i col, 2001b). Per això són necessaris mecanismes específics que permetin la carrega de la molècula a les HDL circulants, mecanisme del que encara no se'n coneixen més detalls. La major part de l'estronea lliure captada a l'intestí és filtrada pel fetge i convertida a esters hidrofílics d'estronea (estronea sulfat principalment), mentre que la major part d'OE absorbit i carregat a HDL passa principalment inalterat a través del fetge. Això és cert essencialment per l'OE transportat en HDL i LDL. Això s'explica per la capacitat que té el fetge de retenir i processar els romanents de QM (Havel, 1998). El fetge és el principal lloc de conjugació d'estrògens amb sulfat (Hernández i col, 1992), i per tant l'estronea lliure que arriba al fetge en la major part es conjuga amb sulfat i l'estronea sulfat resultant i s'elimina per circulació enterohepàtica de manera similar a la descrita pels àcids biliars (Sjovall, 2004). Segons això el fetge faria la funció de barrera per l'estronea lliure que es genera en la hidròlisi en l'intestí quan s'administra OE, o per evitar l'acció de la hormona lliure que s'ingereix en la dieta; i així evitar els efectes que aquesta promouria sobre el creixement i la seva acumulació en els teixits. Un problema en el funcionament hepàtic podria causar doncs, una obesitat induïda per l'estronea de la dieta (Esteve et al, 2001b).

Per tant, una gran part de la dosi oral administrada s'absorbeix inalterada en forma d'OE, es transporta en lipoproteïnes i és captada per alguns teixits o compartiments

fisiològicament actius. És per això que l'administració oral és tant efectiva pel que fa als efectes aprimadors, però en canvi comporta escassos efectes derivats de l'estrone lliure (creixement, deposició de greixos o efectes estrogènics). L'administració oral d'OE no comporta una acumulació de nivells d'estrone de la rata (Massanés i col, 2003).

Pel que fa a la distribució de l'OE en els teixits, una hora després d'haver estat administrada l'hormona, aquesta es troba repartida en una tercera part en teixits (principalment a la sang) i la resta roman al contingut intestinal pràcticament inalterada. Es troba presència d'OE en estómac, intestí, fetge, múscul esquelètic i teixit adipós principalment. L'hipotàlem també mostra gran captació d'OE per gram de teixit, si la comparem amb la resta del cervell (Esteve i col, 2001b), fet que recolza la idea que l'OE funcioni com a senyal de ponderostat.

L'administració intravenosa d'OE en liposomes resulta més estrogènica donats els alts nivells d'estrone lliure generats amb el tractament. D'aquesta manera, passats 10 minuts després d'una injecció a la jugular d'OE marcada radioactivament incorporada en liposomes, només un 60 % de l'hormona present en sang es manté inalterada, un percentatge similar es troba en fetge, i percentatges inferiors al 40 % a la resta dels teixits. Els teixits adiposos no han captat més que un 10 % de radioactivitat en forma d'OE. Així doncs l'eficiència d'hidròlisi dels teixits és molt marcada i molt ràpida, i l'administració intravenosa no resulta en una durada llarga de l'OE en plasma (Sanchis i col, 1997c). Els animals obesos retenen més OE en plasma del que retenen els animals amb normopès, que ràpidament han transferit el marcatge a l'interior dels teixits. Aquesta diferent captació d'OE entre els animals obesos i amb normopès suggereix una alteració en el mecanisme de regulació del recanvi o disponibilitat de l'OE en l'obesitat genètica (Balada i col, 1998).

Els nivells circulants d'OE en rata estan correlacionats directament amb el percentatge de greix corporal de l'animal sempre i quan aquest no sigui obès. Les rates obeses mostren un nivells d'OE circulants més baixos dels que s'esperaria per la quantitat de greix corporal que tenen; suggerint que aquest dèficit d'OE pot ser indicatiu dels problemes de la seva obesitat (Massanés i col, 2003). En el cas dels humans trobem la mateixa correlació que en els animals d'experimentació, de manera que l'IMC o greix corporal i nivells d'OE es troben íntimament correlacionats (Fernandez-Real i col, 1999) excepte en el cas d'obesitat (Cabot i col, 2000b). Està clar doncs, que l'OE té una implicació directa amb l'obesitat, que podria ser tant a nivell de disponibilitat, de funció, o de transferència als teixits fisiològicament actius i que són diana dels efectes terapèutics de l'OE.

El dejuni també afecta els nivells d'OE, igual que en el cas del contingut lipídic de l'animal, però en diferent grau. Així, mentre un dejuni de 48 hores en una rata arriba a reduir en un 25% el contingut lipídic, els nivells d'OE només disminueixen en un 13%; tot i

que si es té en compte el total de la massa circulant d'OE el dejuni provoca una davallada del mateix ordre que el contingut lipídic de l'animal (Vilà i col, 1999)

S'ha de tenir en compte que l'estrone està present en la majoria dels aliments que constitueixen la nostra dieta, donat que es tracta d'una hormona natural relativament abundant que es troba àmpliament distribuïda en els teixits tant d'origen animal com vegetal. Els aliments amb nivells d'estrone més alts són els productes làctics i greixos, seguits d'algunes fruites, carns i ous. També contenen estrone alguns cereals; mentre que els vegetals no tenen nivells detectables de l'hormona (Remesar i col, 1999).

#### **2.4. MECANISME D'ACCIÓ DE L'OE.**

El tractament intravenós amb OE no varia els nivells hipotalàmics de neuropèptid Y en cap dels nuclis estudiats, tant en animals amb normopès com en obesos (Cabot i col, 1998a), malgrat que tendeixen a disminuir en el nucli arquejat. Els nivells d'hormona alliberadora de corticotropina (CRH) en rates amb normopès experimenten un pic als nuclis arquejat i lateral preòptic al dia 10 de tractament intravenós així com una pujada progressiva fins al final del tractament en els nuclis paraventricular i ventromedial. El mateix tractament en animals obesos no altera els nivells de CRH en cap dels nuclis hipotalàmics. Aquests nivells en hipotàlem no tenen cap correlació amb els nivells circulants d'hormona adrenocorticotropina (ACTH) ni corticosterona, que marquen un pic màxim a dia 6 en animals amb normopès i a dia 10 en obesos. Els resultats indiquen doncs, que els efectes de l'OE sobre els nivells de glucocorticoides, no estan mitjançats necessàriament pel CRH dels nuclis hipotalàmics (Cabot i col, 1998b). A més, canvis induïts en els nivells de CRH hipotalàmic requereixen d'un sistema leptinèrgic totalment funcional, ja que no s'observen en rates obeses Zucker fa/fa en que el receptor de la leptina és defectiu.

Els glucocorticoides tenen un paper d'hormones contrarreguladores dels efectes de l'OE, amb la funció de regular els excessos metabòlics induïts pel desajust hormonal, igual com passa amb la leptina (Zakrzewska i col, 1997). El tractament intravenós amb OE provoca un increment molt acusat dels nivells d'ACTH i corticosterona acompanyats d'una disminució de l'expressió hepàtica de la globulina lligadora de glucocorticoides (CBG) i una menor capacitat d'unió de corticosterona en tots els teixits estudiats (Grasa i col, 1998a). L'adrenalectomia induïx una dràstica potenciació dels efectes de l'OE, fins al punt que s'arriba a un fracàs en l'homeòstasi metabòlica amb una pèrdua dramàtica de les reserves energètiques i de la massa proteica (Grasa i col, 1998b). Probablement aquests efectes dels glucocorticoides puguin ser interpretats com una resposta a la massiva pèrdua de reserves

grasses que provoca el tractament, realitzant així el seu paper protector en la alteració del balanç energètic.

Pel que fa a la leptina tampoc sembla ser la mitjançera dels efectes sobre la ingesta, ja que el tractament de rates amb normopès amb OE provoca una davallada molt forta en els nivells circulants de leptina (Adan i col, 1999b; Grasa i col, 2001a), en els nivells tissulars (Remesar i col, 2002) i en l'expressió del gen *Lep* (gen que codifica per la leptina) en teixit adipós (Sanchis i col, 1997a; Adan i col, 1999b). Pel contrari, les rates Zucker obeses fa/fa, no veuen afectats els seus nivells plasmàtics de leptina ni l'expressió del gen *Lep* en TAB com a conseqüència del mateix tractament (Adan i col, 1999b). Així doncs, per dur a terme els efectes sobre els nivells de leptina o la seva expressió, l'OE necessita el receptor de leptina funcional, mitjançant el qual és capaç d'inhibir el gen *Lep*. També es coneix que tant animals mutants pel gen de la leptina (ratolins ob/ob), com mutants pel seu receptor (ratolins db/db i rata fa/fa), són sensibles al tractament amb OE, i per tant perden pes i disminueixen la ingesta tot i no tenir el sistema leptinèrgic correcte (Grasa i col, 2000). Així doncs, els efectes de l'OE sobre el pes corporal tampoc són mediats per la leptina.

Tot i el seu dèbil caràcter estrogènic, l'estrone sempre s'ha considerat un estrogon, tot i la seva baixa afinitat pels receptors d'estrògens. És per això que el nostre grup sempre va considerar la possibilitat que l'OE pogués dur a terme els seus efectes a través dels receptors propis dels estrògens, ja sigui per una acció directa de l'OE sobre el receptor, o mitjançant un dels seus derivats estrogènics als que pot donar lloc (estrone,  $\beta$ -estradiol). Estudis de "*binding*" posen de manifest que l'OE presenta una afinitat gairebé nul·la pel receptor d'estrògens  $\alpha$ , ja que mentre l'estrone s'hi uneix amb baixa afinitat el  $\beta$ -estradiol s'hi uneix amb gran afinitat (Cabot i col, 2001a). Pel que fa als efectes estrogènics, el tractament intravenós amb OE provoca un increment del pes de l'úter i els ovaris junt amb una lleugera proliferació de la glàndula mamària, mentre que l'administració per via oral no induïx cap d'aquests efectes (Cabot i col, 2001b). Probablement aquest diferent comportament sigui degut a una acumulació dels nivells d'estrone amb el tractament intravenós que dóna lloc a un increment significatiu en els nivells d'estradiol que seria el responsable dels efectes estrogènics del tractament intravenós. En canvi el tractament oral no provoca increment en els nivells circulants d'estrògens, protegint així l'organisme dels efectes estrogènics indesitjables.

### 3. EL TEIXIT ADIPÓS BLANC (TAB)

#### 3.1. CONCEPTE ACTUAL DE TAB.

El teixit adipós blanc és el principal òrgan d'emmagatzematge d'energia de l'organisme. Té la capacitat d'acumular greix quan l'aport energètic és excessiu; i de mobilitzar-lo quan l'organisme necessita energia. Per això la cèl·lula adiposa conté tota la maquinària enzimàtica necessària per dur a terme la lipòlisi i la lipogènesi, i és capaç de modificar la seva mida fins a 20 cops el seu diàmetre i cents de vegades el seu volum.

Però en els últims anys s'ha vist que l'adipòcit no només té una funció passiva d'emmagatzematge de reserves sinó que també és responsable de la síntesi i secreció de gran quantitat de factors amb funcions tant auto/paracrines com endocrines. Mitjançant aquestes senyals moleculars l'adipòcit participa en la regulació de múltiples funcions cel·lulars i es comunica amb altres cèl·lules d'altres teixits distants, com l'hipotàlem, el pàncrees, el fetge, el múscul esquelètic, el ronyó, l'endoteli i el sistema immunològic. Estudis amb cocultius han demostrat que l'adipòcit envia senyals directament cap a d'altres teixits, com per exemple el múscul esquelètic o el còrtex adrenal (Dietze i col, 2002; Ehrhart-Bornstein i col, 2003).

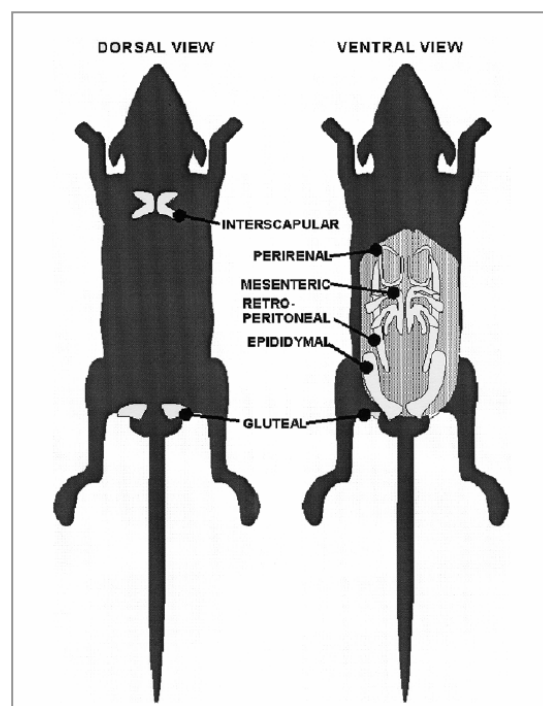


Figura 3: Esquema de la distribució dels dipòsits més representatius de teixit adipós blanc i marró d'una rata adulta.

El TAB està format per dipòsits de cèl·lules adiposes i altres tipus cel·lulars de suport, que es troben distribuïts per l'organisme principalment en dues àrees anatòmiques: subcutània (inguinal, dorsosubcutània, axil·lar i interescapular) i visceral o peritoneal (mesentèric, omental, perirenal, retroperitoneal, epididimal i parametrial) (Cinti, 2005). La combinació dels diversos dipòsits de teixit adipós en un organisme s'ha anomenat "òrgan adipós". (Figura 3)

Un dipòsit de teixit adipós està format per adipòcits madurs, preadipòcits, cèl·lules de l'estroma vascular, vasos sanguinis, nòduls limfàtics i nervis. Dues tercers parts de les cèl·lules són adipòcits madurs que poden variar molt en diàmetre i volum en funció de l'edat i el desenvolupament d'obesitat (Hauner, 2004). Dins una mateixa població d'adipòcits es troba molta heterogeneïtat de mida, que en el cas dels humans es pot trobar entre 70 i 120µm de diàmetre. Però l'heterogeneïtat disminueix quan es desenvolupa obesitat, suggerint així que la cèl·lula adiposa té una mida màxima establerta, variable entre espècie i espècie, a partir de la qual ja no pot continuar creixent, i que es coneix amb el nom de mida crítica de l'adipòcit.

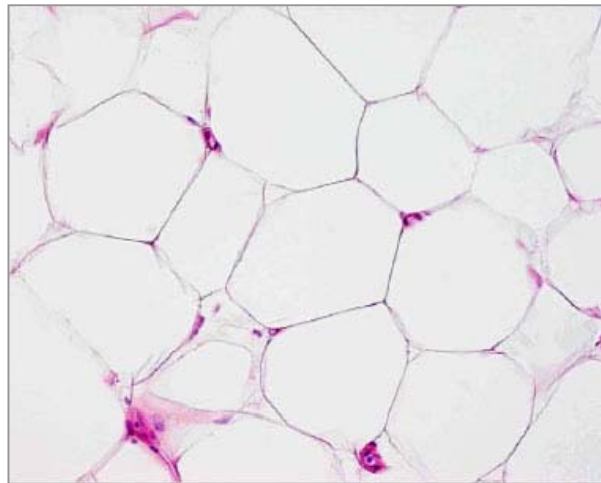


Figura 4. Microfotografia de teixit adipós blanc humà. Tinció amb hematoxilina-eosina. Objectiu de 20X (Cinti, 2005).

Els preadipòcits que es troben infiltrats a la massa adiposa estan adquirint en els darrers anys molta importància. Aquestes cèl·lules, a més de ser les precursoras dels adipòcits madurs, es comporten també com a cèl·lules mare mesenquimals multipotencials, i per tant són capaces de diferenciar-se a altres tipus cel·lulars (cèl·lules musculars, condriòcits i altres) (Zuk i col, 2001; Winter i col, 2003). Així doncs, serien molt útils per noves teràpies basades en l'enginyeria tissular tals com la regeneració de cartílags en

l'osteoartritis. Estudis recents suggereixen també que aquestes cèl·lules poden diferenciar-se a macròfags (Cousin i col, 1999), cèl·lules endotelials (Planat-Bernard i col, 2004a) o inclús cardiomiòcits (Planat-Bernard i col, 2004b).

Estudis recents demostren que els adipòcits madurs no són cèl·lules definitivament diferenciades, és a dir, que poden tornar a entrar al cicle cel·lular i donar lloc a cèl·lules precursoras amb capacitat de proliferació. Aquests precursors poden donar lloc a adipòcits nous, a adipofibroblastes o inclús altres formes cel·lulars. En el cas dels adipòcits humans provinents de liposucció, s'ha aconseguit la total desdiferenciació a fibroblastes; i un cop proliferats es poden tornar a convertir en adipòcits amb capacitat de síntesi lipídica (Tholpady i col, 2005). Així doncs, l'enorme plasticitat cel·lular dels adipòcits els converteix en perfectes candidats per l'estudi de noves teràpies en medicina regenerativa (Casteilla i col, 2004) o la millora de la producció de carn animal (Dodson i col, 2005).

El TAB rep innervació simpàtica i parasimpàtica que afecta la lipòlisi en l'adipòcit. Fa molts anys que es coneix la presència de nervis simpàtics al teixit adipós, però encara ara hi ha certa controvèrsia en el fet de si aquests nervis fan sinapsi només amb els vasos sanguinis o bé si també o fan amb alguns adipòcits (Slavin i col, 1978).

Darrerament s'ha estudiat molt la relació entre obesitat i inflamació. Un 10% de les cèl·lules de l'estrona vascular són macròfags CD14+ i CD31+ (Curat i col, 2004). El nombre de macròfags presents en TAB està directament correlacionat amb l'adipositat i la mida dels adipòcits, tant en el cas dels humans com en ratolins (Weisberg i col, 2003 ; Xu i col, 2003). D'altra banda, tot i que es sap que els preadipòcits poden diferenciar-se a macròfags, l'origen dels macròfags en TAB pot no ser provinent dels preadipòcits (Cousin i col, 1999). Així, els macròfags de TAB provenen, en part, de monòcits circulants infiltrats (Weisberg i col, 2003). Les molècules responsables del reclutament dels monòcits sanguinis (proteïna quimioattractant de monòcits 1 o MCP-1) són secretades pels adipòcits, i per tant els seus nivells també correlacionen amb l'adipositat (Christiansen i col, 2005). Aquests macròfags són els principals secretors de  $TNF\alpha$  de TAB, molècula inflamatòria que contribueix en un 50% en la inducció de la secreció de la IL-6 derivada de TAB (Weisberg i col, 2003). De fet tant  $TNF\alpha$  com IL-6 estan directament correlacionades amb l'adipositat i la resistència a la insulina (Cottam i col, 2004).

Així doncs, el TAB dels individus obesos té més quantitat de macròfags que el dels individus amb normopès, i aquests macròfags a més, es troben activats tant morfològicament (cèl·lules multinucleades gegants) com funcionalment (productores de citocines).

Tot i que els limfòcits no són cèl·lules que constitueixin el TAB, sí que es troben sovint molt pròxims a ell. És el cas dels nòduls limfàtics, que normalment es troben envoltats per una capa de TAB pericapsular. Hi ha estudis que confirmen l'existència d'interaccions paracrines entre els limfòcits i els adipòcits adjacents (Pond, 2003), però aquest és un tema que encara no ha estat gaire explorat.

### 3.2. REGULACIÓ DELS DIPÒSITS DE GREIX: METABOLISME

Com ja s'ha mencionat anteriorment, el TAB és el principal reservori d'energia de l'organisme. Per mantenir les reserves en relació a les necessitats de l'organisme el TAB és capaç d'acumular o eliminar greixos en funció de les necessitats del moment. El balanç entre l'energia ingerida i el consum energètic marcarà l'activació d'uns o altres mecanismes.

La funció del TAB en l'emmagatzematge d'energia comença després de la ingesta, en que els greixos ingerits en forma de TAGs i digerits fins a monoacilglicèrids i àcids grassos seran captats pels enteròcits. Aquestes mateixes cèl·lules resintetitzaran els TAGs que seran incorporats en Quilomicra (QM) i secretats a la circulació limfàtica i més tard a la sang per arribar a tots els teixits. D'altra banda, els aminoàcids i la glucosa absorbits de la dieta viatjaran a través de la circulació portal fins al fetge, on seran, en part, metabolitzats a acetil-CoA que podrà intervenir en la síntesi d'àcids grassos. Aquests àcids grassos també seran fàcilment esterificats a TAGs i incorporats a VLDL. Així doncs, tant els QM procedents de l'intestí com les VLDL alliberades pel fetge transportaran els TAGs a tot l'organisme, i un cop hidrolitzats a àcids grassos per la lipoproteïna lipasa (LPL) de l'endoteli dels teixits, serviran de combustible de molts teixits. El teixit adipós reesterificarà els àcids grassos que li arriben amb glicerol per tal de formar TAGs que podrà emmagatzemar com a font d'energia. D'altra banda, els àcids grassos també poden ser sintetitzats *de novo* en teixit adipós a partir de glucosa (lipogènesi).

En canvi, durant el dejuni, el teixit adipós ajuda a mantenir la homeòstasi calòrica de la sang mitjançant la hidròlisi dels TAGs en àcids grassos i glicerol, que seran alliberats a la circulació sanguínia. Els àcids grassos alliberats seran utilitzats per la majoria dels teixits com a combustible durant el dejuni, en canvi, el glicerol serà utilitzat principalment pel fetge per convertir-lo a glucosa (gluconeogènesi).

El funcionament paral·lel de les vies de síntesi i hidròlisi garanteixen una renovació constant del pool de TAGs. Mentre els TAGs s'estan hidrolitzant per produir àcids grassos, els adipòcits estan reesterificant part d'aquests àcids grassos a TAGs, i es sintetitzen nous àcids grassos per lipogènesi. Es tracta, en certa manera, d'un procés de reciclatge de les reserves (Forest i col, 2003). Però si l'organisme rep un estímul nutricional o hormonal, la



taxa de síntesi o hidròlisi pot augmentar, de manera que el balanç sigui d'incrementar o disminuir els TAGs emmagatzemats.

### 3.2.1. REGULACIÓ DEL CATABOLISME (LIPÒLISI)

El control de la lipòlisi és complex i implica gran varietat de molècules: efectors lipolítics i antilipolítics, receptors, vies de senyalització, lipases (HSL, desnutrina...), i altres proteïnes (perilipines).

La resposta lipolítica de l'adipòcit depèn d'una sèrie de vies d'estimulació i inhibició. Tot i que la resposta lipolítica a curt termini és prou coneguda, es sap que també hi ha lipòlisi a llarg termini, mecanismes de la qual encara es desconeixen moltes coses.

La resposta a curt termini està bàsicament regulada per una sèrie d'activacions/inhibicions que es donen per fosforilació/desfosforilació d'enzims claus de la via. Així doncs, les quinases tenen un paper clau en la regulació de la seqüència de senyalització. La *Proteïna Quinasa A (PKA)* és la principal quinasa implicada en l'activació de la lipòlisi (Londos i col, 1999). És la quinasa responsable de la fosforilació de la *Lipasa Sensible a Hormones (HSL)* i de les *perilipines*. Fins fa poc, es pensava que l'HSL era l'única lipasa implicada en la lipòlisi, responsable de catalitzar la hidròlisi dels TAGs a diacilglicèrids i monoacilglicèrids (Yeaman, 2004; Holm, 2003; Kraemer i Shen, 2002), que després serien hidrolitzats a àcids grassos i glicerol mitjançant la monoacilglicerol-lipasa. En l'últim any aquest concepte ha canviat lleugerament. S'han descobert noves lipases amb un paper tant o més rellevant que la HSL (Raben i Baldassare, 2005). La *desnutrina* (Villena i col, 2004), l'*ATGL* (adipocyte triglyceride lipase) (Zimmerman i col, 2004) o l'*l'PLA<sub>2</sub>ζ* (calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub>s isoforma ζ) (Jenkins i col, 2004) han resultat ser la mateixa lipasa identificada simultàniament per tres investigadors independents. La presència de lipòlisi basal en ratolins *knock-out* per l'HSL va fer pensar en l'existència d'altres lipases diferents d'HSL. A més, aquests ratolins tenien una acumulació de diacilglicèrols en teixit adipós, en lloc de TAGs com es podia esperar (Haemmerle i col, 2002). Els darrers estudis posen de manifest que la nova lipasa té activitat hidrolítica sobre els TAGs donant lloc a diacilglicerols que més tard seran hidrolitzats per l'HSL. Aquestes dades concorden amb estudis bioquímics realitzats amb l'HSL que demostren que aquesta lipasa té fins a deu vegades més activitat específica sobre els diacilglicerols que no pas sobre els TAGs (Fredikson i col, 1981).

Les perilipines són proteïnes que es troben a la superfície de la vacuola lipídica i que actuen com a reguladores de la homeòstasi energètica. La sobreexpressió de perilipina A ectòpica provoca una inhibició de la hidròlisi de TAGs basal alhora que una potenciació de

la resposta lipolítica a activació de PKA (Tansey i col, 2003). Estudis recents mostren que no només és necessària la fosforilació per activar la HSL, sinó que també és imprescindible la seva translocació des del citosol fins a la superfície de la vacuola lipídica (Brasaemle i col, 2000). Les perilipines són necessàries per tal de mediatitzar la translocació de l'HSL dependent de PKA (Sztalryd i col, 2003), i la fosforilació de les perilipines permet la interacció de l'HSL amb la vacuola lipídica (Holm, 2003). Hi ha altres proteïnes implicades en la translocació de l'HSL, així com la FABP4, proteïna a la que l'HSL s'uneix provocant així una estimulació de la lipòlisi dependent d'àcids grassos (Yeaman, 2004) .

La PKA exerceix un paper regulador de la lipòlisi molt important, però alhora, aquesta està regulada per d'altres molècules intracel·lulars. El principal regulador de la PKA és l'AMPc, molècula que funciona com a segon missatger: un increment intracel·lular d'AMPc desencadena la lipòlisi dels TAGs, mentre que una reducció dels seus nivells intracel·lulars, inhibeix la lipòlisi. Els nivells intracel·lulars de AMPc estan regulats per la activació o inhibició de l'enzim que en catalitza la seva síntesi, l'*adenilat ciclasa*, i per la regulació del que en controla la degradació, la *fosfodiesterasa-3-B (PDE3B)*. Aquests dos enzims seran doncs, dos punts de regulació importants de la lipòlisi.

A nivell de la adenilat ciclasa trobem diverses molècules reguladores. Els agonistes adrenèrgics són els més importants activadors/inhibidors de lipòlisi. Hi ha diferents tipus de receptors adrenèrgics, els  $\beta$ -adrenèrgics (amb 4 subtipus), els  $\alpha$ 1-adrenèrgics i els  $\alpha$ 2 adrenèrgics (cadascun amb 3 subtipus). Tots ells són receptors de la superfamília de receptors acoblats a proteïnes G (Nagatomo i col, 2001; Nathanson, 2003). Les proteïnes G que duen acoblades s'encarreguen de transmetre la senyal del receptor fins a la adenilat ciclasa: les proteïnes Gs activen l'adenilat ciclasa mentre que les Gi la inhibeixen. Els agonistes  $\beta$ -adrenèrgics activaran la adenilat ciclasa mitjançant el seu receptor acoblat a proteïnes Gs, mentre que en el cas dels agonistes  $\alpha$ 2, les proteïnes Gi acoblades al seu receptor exerciran una regulació negativa de l'adenilat ciclasa. També el receptor d'adenosina té proteïnes Gi acoblades, amb el que la presència d'adenosina inhibirà el procés lipolític.

La insulina efectua el seu paper anabòlic en la regulació de la lipòlisi a través del seu receptor. La via de senyalització de la insulina provoca una activació de la PDE3B, que conseqüentment inhibirà la PKA i finalment la HSL.

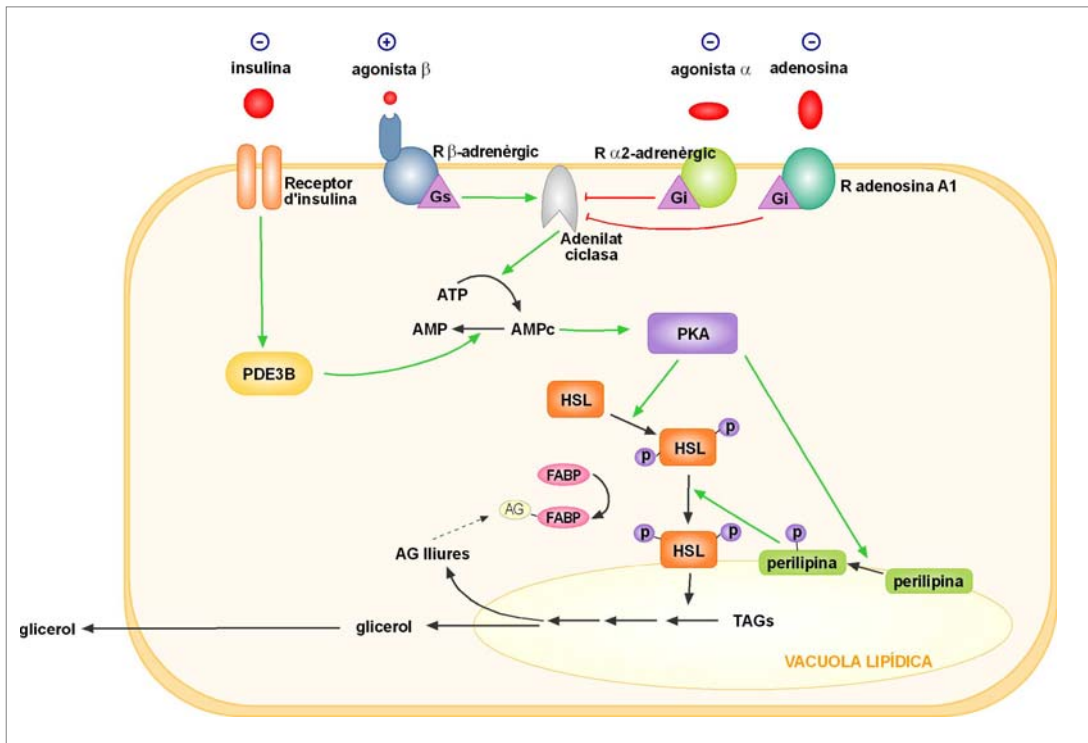


Figura 5: Esquema de la regulació de la lipòlisi en una cèl·lula de TAB. Diferents senyals metabòlics, activadors (+) i inhibidors (-), de lipòlisi en la cèl·lula adiposa interactuen amb els seus receptors de membrana i donen lloc a una cascada de senyalització que provoca una activació/inhibició de la lipòlisi. En verd es mostren les vies d'activació i en vermell les inhibicions.

Darrerament s'ha demostrat però que la PKA no és la única responsable de la fosforilació de l'HSL. Quinases com ERK1/2 MAPK, Glicogen sintasa quinasa-4 (Olsson i col, 1986), quinasa dependent de  $Ca^{2+}$ /Calmodulina II i proteïna quinasa AMP-activada (AMPK) (Garton i col, 1989) fosforilen HSL en una posició diferent de PKA, podent modular així l'activitat lipolítica. L'AMPK s'ha proposat com una quinasa fisiològicament rellevant (Hardie i Carling, 1997), basant-se en la seva implicació en altres aspectes del metabolisme lipídic, sovint a nivell de regulació de la transcripció, relacionant-la així amb una regulació a llarg termini de la lipòlisi.

A més dels mecanismes descrits fins ara, es postula l'existència d'altres nivells de regulació de l'activitat lipolítica i de l'HSL. Així doncs, és el cas de la leptina, que tot i haver-ne demostrat una activitat estimuladora de la lipòlisi tant *in vivo* (Frühbeck i col, 1998) com *in vitro* (Frühbeck i col, 1997, Wang i col, 1999), encara no es coneix el mecanisme pel qual duu a terme la seva acció sobre la lipòlisi. El més sorprenent dels seus efectes és que l'alliberació d'àcids grassos no acompanya l'alliberació de glicerol, cosa que implica una activació simultània de la oxidació d'àcids grassos dins la cèl·lula (Wang i col, 1999). Hi ha opinions contradictòries a la literatura científica sobre si el tractament amb leptina estimula o

no l'expressió d'HSL. Mentre que fins fa poc es defensava que els efectes lipolítics de la leptina afectaven a nivell de fosforilació de l'enzim (Yeaman, 2004), segons una publicació molt recent, el tractament crònic amb leptina a nivell intraventricular, provoca un increment en els nivells d'ARNm d'HSL en teixit adipós blanc (Tajima, 2005). Hi ha evidències que demostren que la hormona del creixement (GH) estimula la lipòlisi per la via de senyalització de JAK/STAT, però encara no es coneixen els mecanismes moleculars que vinculin l'activació d'aquesta quinasa amb la fosforilació de l'HSL que s'havia proposat anteriorment com a punt de regulació de la GH (Asada, 2000).

En la regulació a llarg termini hi ha també força controvèrsia. Estudis en adipòcits en cultiu han estat els més recorreguts per buscar efectes de diferents factors hormonals i nutricionals sobre l'expressió del gen de l'HSL. L'AMPc i els esters de forbol disminueixen l'expressió de l'enzim via diferents mecanismes (Plee-Gautier i col, 1996). La insulina, l'àcid retinoic (Plee-Gautier i col, 1996) i l'àcid oleic (Raclot i col, 1998), l'adrenalina i la GH (Slavin i col, 1994) no n'afecten l'expressió. Pel que fa a la dexametasona es troben resultats contradictoris, de manera que es descriu tant un increment de 4 vegades l'expressió de l'HSL (Slavin i col, 1994), com una manca d'efecte (Plee-Gautier i col, 1996). En el cas de la carència de glucosa també hi ha discrepància de resultats, en cèl·lules en cultiu 3T3-F442A s'observa una reducció d'entre 2,5 - 3 cops l'expressió d'HSL (Raclot i col, 1998), mentre que en adipòcits de rata en cultiu primari no es troba aquest efecte amb la glucosa sola però sí una sobreexpressió en resposta a combinació d'alts nivells de glucosa i insulina (Botion i Green, 1999). En el cas de  $TNF\alpha$  també hi ha estudis que defensen una infraexpressió de l'HSL provocada pel tractament (Sumida i col, 1990), mentre que d'altres estudis no observen canvis en l'expressió (Green i col, 1994).

### 3.2.2. REGULACIÓ DE L'ANABOLISME: SÍNTESI DE TAGS I EMMAGATZEMATGE

La principal font de TAGs dels adipòcits prové de les VLDL i els QM que es troben circulant pel plasma. Els TAGs d'aquestes lipoproteïnes són hidrolitzats a àcids grassos i glicerol per la lipasa que es troba a l'endoteli dels capil·lars del teixit adipós. La *Lipoproteïna Lipasa (LPL)*, és doncs, el primer punt de regulació de l'emmagatzematge de TAGs en TAB. La LPL és un enzim que es sintetitza a l'adipòcit i es secreta a les cèl·lules endotelials adjacents. L'expressió i l'activitat de la LPL en TAB incrementa durant la ingesta, sobretot en dietes riques en glúcids.

Tant els àcids grassos que circulen en plasma units a albúmina com els alliberats de les lipoproteïnes per la LPL, són captades per l'adipòcit mitjançant un mecanisme de transport que a hores d'ara encara crea certa controvèrsia. Estudis de models de sistemes

de membrana, amb cèl·lules intactes i aproximacions amb tècniques de fluorescència dual, han donat força evidències que els àcids grassos difonen molt ràpidament través de la membrana plasmàtica (Hamilton i col, 2002). El pas a través de bicapa lipídica succeeix per flip-flop dels àcids grassos en la seva forma no ionitzada (Hamilton i Kamp, 1999; Hamilton i col, 2002). Amb el descobriment de proteïnes lligadores d'àcids grassos (FABPs) en la membrana plasmàtica, s'ha intentat justificar el significat de la presència dels dos tipus de transport (Glatz i Storch, 2001). S'ha proposat la coexistència dels dos mecanismes com dues rutes separades, contribuint cadascuna d'elles en dependència del tipus cel·lular, de la disponibilitat d'àcids grassos o dels estímuls hormonaals. D'altra banda es proposa la funció de les proteïnes de membrana com l'acceptador d'àcids grassos, mentre que es reserva el transport a través de la bicapa lipídica a un transport de difusió passiva (Glatz i col, 2002). Hi ha diferents proteïnes transportadores d'àcids grassos en membrana d'adipòcits, la Translocasa d'àcids grassos (FAT/CD36), la proteïna transportadora d'àcids grassos (FATP), o la Proteïna lligadora d'àcids grassos de membrana plasmàtica (FABPpm). La FAT i la FATP són proteïnes integrals de membrana mentre que la FABPpm és una proteïna unida a l'exterior de la membrana. Estudis recents suggereixen que la FATP actuaria associada a la acil-CoA sintetasa (FACS), enzim que evita l'eflux dels àcids grassos incorporats convertint-los en derivats d'acil-CoA, fet que la convertiria en una proteïna de transport d'àcids grassos unidireccional (Herrmann i col, 2001; Fisher i Gertow, 2005; Richards i col, 2006).

Un cop a l'interior cel·lular, els àcids grassos s'uneixen a les proteïnes lligadores d'àcids grassos. La més important en l'adipòcit és, amb diferència, la proteïna lligadora de lípids adipocitària (ALBP), també coneguda com aP2, A-FABP o FABP4. Fins fa poc, es considerava una proteïna marcador d'adipòcits, però des de l'any 2001 es sap que s'expressa també en macròfags, posant de manifest la seva rellevància en l'estudi de l'aterosclerosi (Makowski i col, 2001). Tot i ser la proteïna lligadora més abundant en l'adipòcit, cal dir que, quan aquesta proteïna no s'expressa, es produeix una forta inducció de l'expressió de la proteïna lligadora de lípids de queratinòcits (KLBP), resultant una morfologia de teixit adipós totalment normal (Simpson i col, 1999). La ALBP s'activa per PPAR $\gamma$ -RXR $\alpha$  durant el procés de diferenciació adipocitària (Tontonoz i col 1994), i els mateixos àcids grassos activen la transcripció de la proteïna transportadora en cèl·lules preadiposes (Amri i col, 1991), en aquest cas mitjançant el control de PPAR $\delta$  (Bastie i col, 2000).

La ALBP transporta els àcids grassos fins al domini de reacció de l'acil-CoA sintetasa, que generarà els substrats per la síntesi dels TAGs. El glicerol-3P necessari per a la formació dels TAGs provindrà, gairebé en la seva totalitat, del sintetitzat a partir de la glucosa captada per la cèl·lula, donat que la majoria del glicerol generat de la hidròlisi per la LPL

serà retornat a la circulació. Per tant, modificacions en el flux d'entrada de glucosa a través dels receptors GLUT-4, tindran un impacte important en el recanvi de TAGs d'aquests adipòcits. En aquest punt, el glicerol procedent de la glucosa s'anirà esterificant amb diversos enzims amb acil-CoA per dur a terme la biosíntesi de nous TAGs.

Però la síntesi dels TAGs també pot provenir de la lipogènesi *de novo*, procés que sintetitza els àcids grassos de nou a partir de substrats no lipídics. El principal substrat d'aquesta síntesi és la glucosa captada per l'adipòcit. La contribució del teixit adipós a la síntesi *de novo* d'àcids grassos és menys activa que en fetge quan l'expressem per gram de teixit, però si comparem els pesos absoluts d'aquests teixits a l'organisme, ens adonem que, en el cas dels humans, un adult produeix la mateixa quantitat diària d'àcids grassos per lipogènesi en tots dos teixits (entre 1-2g/dia en cada teixit o fins a 4g/dia en total). D'altra banda s'ha de dir que en rates, la contribució del teixit adipós a la lipogènesi és força superior que en humans (Shrago i col, 1971; Letexier i col, 2003). Aquest fet es va atribuir principalment a les diferències en la dieta d'una rata de laboratori (rica en carbohidrats), i la d'un humà sa (rica en greixos, al menys en països desenvolupats); donat el conegut efecte estimulador de la lipogènesi dels carbohidrats i l'inhibidor dels lípids (Foufelle i Ferré, 2002; Kersten, 2001). Recentment noves tendències atribueixen aquestes diferències en l'expressió d'alguns factors de transcripció que regulen l'expressió dels enzims lipogènics, com és el SREBP-1c (sterol regulatory element binding protein 1c) o factors de transcripció que mediatitzen l'efecte estimulador de la glucosa sobre l'expressió de la via lipogènica, com és el ChREBP (Carbohydrate regulatory element binding protein) (Letexier i col, 2003).

L'SREBP-1c ha adquirit gran importància per ser un dels factors de transcripció implicats en la regulació de l'expressió gènica de la insulina. És un membre de la família de factors de transcripció SREBP i actua activant elements de resposta a la insulina en regions promotores de gens que responen a la insulina. Un cop la insulina l'ha activat, l'SREBP1c indueix l'expressió de diversos gens involucrats en la síntesi d'àcids grassos i TAGs (Kim i col, 1998; Kim i col, 2004; Le Lay i col, 2002). El paper de SREBP-1c com a mediador de la insulina per induir lipogènesi en fetge està àmpliament acceptat, però en adipòcits 3T3-L1, tot i que hi ha diversos estudis que ho accepten (Nadeau i col, 2004; Kim i col, 2004), encara hi ha certa discrepància (Kersten, 2001)

Els enzims claus de la via lipogènica són l'àcid gras sintasa (FAS) i la acetil-CoA carboxilasa 1 (ACC1), totes dues presents en teixit adipós (Letexier i col, 2003). Aquests dos enzims s'han considerat els principals punts de regulació de la via lipogènica *de novo*, i les seves expressions es veuen afectades per les variacions de la dieta i els estímuls hormonal.

La **FAS** catalitza la síntesi dels àcids grassos saturats (palmitat, esterat o miristat) utilitzant acetil- i malonil-CoA. Funciona com un homodímer d'una proteïna multifuncional

que conté set dominis catalítics i un lloc pel grup prostètic 4'-fosfopantateina (Smith i col, 2003). S'expressa amb força abundància en teixit adipós i té un paper rellevant en la homeòstasi energètica per la seva vinculació en la lipogènesi i la  $\beta$ -oxidació. La majoria del que es coneix sobre la funció metabòlica de FAS prové d'estudis realitzats amb 2 inhibidors de FAS: la cerulenina i el C75. Així, l'administració de C75 causa una disminució de la ingesta dosi-dependent en ratolins BALB/c mentre que bloqueja la sobre-expressió induïda per la gana dels neuropèptids orexigènics (AGRP i NPY) i la infra-expressió dels neuropèptids anorexigènics (CART i POMC) en l'hipotàlem (Loftus i col, 2000; Shimokawa i col, 2002). L'administració ICV, tant de C75 com de cerulenina, provoca també una davallada en la ingesta de forma dramàtica, que pot ser evitada amb la administració ICV de NPY (Loftus i col, 2000). Es postula que els alts nivells de malonil-CoA provocats per la inhibició de FAS en l'hipotàlem, puguin ser els responsables de la regulació de l'expressió dels neuropèptids (Loftus i col, 2000). Per tant, FAS pot representar una diana terapèutica important per al control de la ingesta.

La **ACC1** catalitza el primer pas de la lipogènesi carboxilant l'acetil CoA a malonil CoA. És la isoforma d'ACC principal dels teixits lipogènics, amb una funció diferent de la isoforma dels teixits oxidatius (ACC2). L'enzim ACC1 es troba al citosol cel·lular i és la isoforma predominant en teixit adipós, donat que la funció oxidativa d'aquest teixit és reduïda. El seu paper fonamental en teixit adipós és regular la síntesi de lípids i la seva activitat alhora es troba regulada pel citrat i l'AMP quinasa (AMPK)(Hardie i Pan, 2002). El citrat sembla ser un activador al·lostèric d'ACC, segons indica la correlació positiva existent entre els nivells de malonil-CoA i citrat. La AMPK fosforila ACC inhibint així la seva activitat, causant així una reducció dels nivells de malonil-CoA. Inhibidors d'ACC s'han utilitzat per estudiar els efectes de l'enzim, tot i que no hi ha específics de la isoforma de teixit adipós, pel que afecten tant la ACC1 (lipogènica) com la ACC2 (oxidativa). Quan s'estudien els efectes d'aquests inhibidors *in vivo* s'observa una reducció de la síntesi de TAGs i una elevada oxidació de lípids en rates, amb una davallada dels nivells de malonil-CoA en fetge, cor i múscul. (Harwood i col, 2003)

La lipogènesi és una via molt afectada pels canvis en la dieta. La ingesta d'una dieta rica en glúcids estimula la lipogènesi adiposa (a més de l'hepàtica), mentre que el dejuni redueix la lipogènesi en teixit adipós alhora que estimula la lipòlisi aconseguint una pèrdua de TAGs en les cèl·lules adiposes.

La glucosa estimula la lipogènesi a través de diversos mecanismes. Primer que res, la mateixa glucosa és el substrat de la lipogènesi *de novo*, ja que en ser convertida a acetil-CoA per la glucòlisi, la glucosa estimula la síntesi d'àcids grassos. La segona via d'activació lipogènica de la glucosa és la inducció de l'expressió de gens lipogènics mitjançant

l'estimulació de l'expressió dels SREBP-1c. I finalment, la glucosa incrementa la lipogènesi perquè estimula l'alliberació d'insulina i inhibeix la alliberació de glucagó en el pàncrees.

La insulina és probablement un dels factors hormonals més importants en la regulació de la lipogènesi. Les seves principals formes d'induir la lipogènesi són incrementar la captació de glucosa alhora que activa alguns enzims lipogènics i glucolítics mitjançant modificacions covalents. La insulina també exerceix una regulació a llarg termini estimulando l'expressió de gens lipogènics (Assimakopoulus-Jeannet i col, 1995), probablement via SREBP-1c.

La hormona del creixement redueix la lipogènesi dràsticament en teixit adipós, provocant una significativa pèrdua de lípid lligada a un increment de la massa muscular (Etherton, 2000). Aquests efectes els duu a terme disminuint la sensibilitat a la insulina i produint així una reducció en la expressió de la FAS en teixit adipós. (Yin i col, 1998).

Sembla que la leptina té un efecte directe sobre la lipogènesi en teixit adipós, ja que s'ha vist que la redueix en adipòcits (Wang i col, 1999). Estudis amb microarrays han comprovat que la leptina redueix l'expressió de gens relacionats amb la síntesi d'àcids grassos i la de TAGs (Soukas i col, 2000). Hi ha treballs que proposen que els seus efectes sobre l'expressió de dianes lipogèniques s'esdevé també via SREBP-1c (Kakuma i col 2000).

### 3.3. EL TAB COM A ÒRGAN ENDOCRÍ

El TAB sintetitza i allibera una gran varietat de compostos peptídics i no peptídics que utilitza per comunicar-se amb les seves pròpies cèl·lules i les dels altres teixits. Actualment es coneixen fins a una cinquantena de molècules secretades pel TAB de diferents naturaleses i funcions fisiològiques, i diàriament el nombre incrementa amb nous descobriments.

Inicialment es van anomenar adipocitocines totes aquelles molècules alliberades pel teixit adipós, doncs moltes d'elles eren de la família de les citocines. Tot i que això és cert per algunes d'elles (TNF $\alpha$  i IL-6), s'ha optat per canviar el nom del grup per adipocines, de manera que inclou totes les molècules secretades independentment de la seva naturalesa i funció (Trayhurn i Wood, 2004).

La diversitat d'adipocines pel que fa a estructura molecular o funció és considerable (figurax). El grup inclou: citocines clàssiques (TNF $\alpha$ , IL-6, IL-8), factors de creixement (Factor de transformació del creixement o TGF- $\beta$ ), proteïnes del sistema alternatiu del complement (adipsina, proteïna d'estimulació d'acilació o ASP), proteïnes implicades amb l'homeòstasi vascular (inhibidor de l'activador del plasminògen 1 o PAI-1, Factor de teixit),



de regulació de la pressió sanguínia (angiotensinògen), metabolisme lipídic (proteïna lligadora de retinol o RBP, proteïna transferidora d'esters de colesterol o CETP), homeòstasi glucídica (adiponectina, resistina), angiogènesi (factor de creixement endotelial vascular o VEGF) i fins i tot de resposta de fase aguda o estrès (haptoglobina o metalotioneïna). Sovint també es parla de productes de secreció de l'adipòcit referint-se a molècules com la LPL, l'Apolipoproteïna E o els àcids grassos. No oblidem tampoc hormones secretades per l'adipòcit implicades amb la regulació de la ingesta com són la leptina i l'OE.

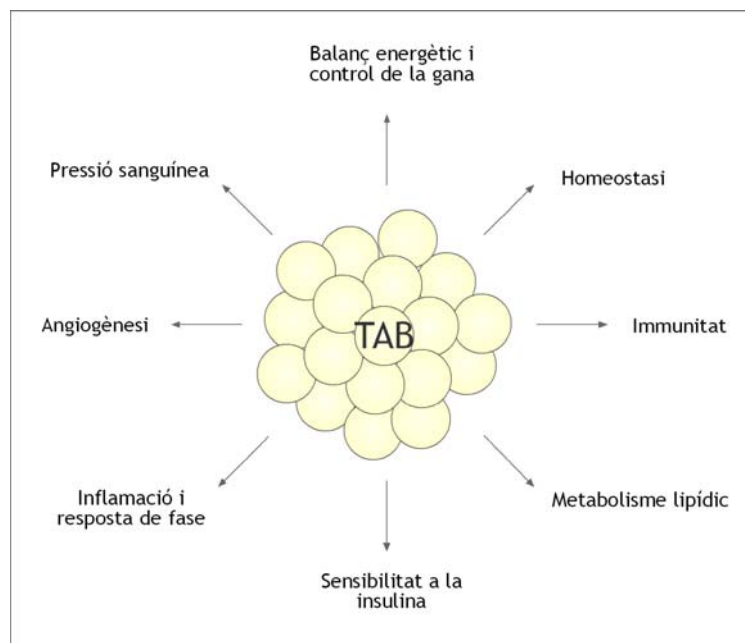


Figura 6. Funcions principals de les molècules secretades pel teixit adipós blanc (adaptació de Trayhurn i Wood, 2004).

Al contrari del que es pensava fa uns anys, no tots els productes alliberats pel TAB són produïts pels adipòcits. Cada vegada hi ha més evidències que els preadipòcits i les cèl·lules endotelials contribueixen en aquesta funció endocrina del TAB. És per exemple, el cas dels estrògens o el PAI-1, que es sintetitzen als preadipòcits. També, tal i com ja s'ha comentat abans, els macròfags hi contribueixen amb la secreció de proteïnes proinflamatòries.

Donat que són tants els productes alliberats pel TAB, ens centrarem en els que considerem que poden tenir un paper més important en el procés de mobilització i acumulació de lípids en el TAB.

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

TNF $\alpha$  és una citocina que es produeix principalment en macròfags i que va ser descrita inicialment per la seva capacitat de causar necrosi en tumors i d'induir caquèxia. En el TAB, el TNF $\alpha$  també s'expressa en adipòcits i en les cèl·lules de l'estroma vascular (Fain i col, 2004). La seva expressió varia en els diferents dipòsits adiposos, sent major en el TAB subcutani que en el visceral (Fain i col, 2004). TNF $\alpha$  juga també un paper important en l'obesitat i la resistència a la insulina. La seva expressió està incrementada en obesos i manté una correlació positiva amb la adipositat i la resistència a la insulina (Ruan i col, 2003; Hotamisligil i col, 1993). Tot i que els nivells circulants de TNF $\alpha$  són baixos, aquests correlacionen també amb l'obesitat i la resistència a la insulina (Fernandez-Real i col, 2003). El TNF $\alpha$  actua reduint el pes corporal com a conseqüència d'una substancial reducció de la massa de teixit adipós. (Warne, 2003). En aquest sentit s'ha descrit que TNF $\alpha$  reprimeix l'expressió gènica de l'adipòcit mitjançant la "down-regulation" dels dos factors de transcripció claus de l'adipòcit CCAAT/enhancer binding protein  $\alpha$  (C/EBP $\alpha$ ) i el receptor activat de proliferació peroxisomal (PPAR $\gamma$ 2), causant una desdiferenciació de la cèl·lula adiposa i inhibició de la adipogènesi (Stephens i Pekala, 1992; Xing i col, 1997; Xu i col, 1999). A més, la estimulació de la lipòlisi (Ryden i col, 2002; Zhang i col, 2002) i la inducció de l'apoptosi de l'adipòcit (Prins i col, 1997; Qian i col 2001; Zhang i col, 2001), contribueixen a la pèrdua de TAB.

### 3.3.2. Adiponectina

Aquesta adipocina es va caracteritzar entre els anys 1995 i 1996 per diferents grups amb diferents mètodes. D'aquí la gran varietat de noms pels que se la coneix (apM1, Acrp30, adipoQ i GBP28). L'adiponectina s'expressa en gran quantitat i de manera específica en adipòcits diferenciats i circula amb nivells força alts per sang (Chandran i col, 2003). La seva expressió és superior en els TAB subcutani que en el visceral (Fain i col, 2004). Els nivells plasmàtics d'adiponectina, al contrari que la resta d'adipocines, disminueixen amb l'obesitat (Arita i col, 1999), la resistència a la insulina (Hotta i col, 2000), la hiperinsulinèmia (Weyer i col, 2001) i les malalties coronàries (Kumada i col, 2003). Així doncs, es creu que una hipoadiponectinèmia pot contribuir a aquestes patologies (Hotta i col, 2001), ja que l'administració d'adiponectina pot millorar els paràmetres metabòlics de l'obesitat o la lipodistròfia (Chandran i col, 2003; Diez i col, 2003; Kinlaw i col, 2004). A més de la forta correlació negativa amb l'IMC i la massa grassa corporal, els nivells d'adiponectina estan sotmesos a dimorfisme sexual, amb nivells del 50% majors en el cas de les dones que els homes. D'acord amb això, s'ha observat que els andrògens disminueixen l'expressió d'adiponectina (Nishizawa i col, 2002). En estudis *in vitro*, l'expressió d'adiponectina en

adipòcits, està reprimida per factors que es troben elevats en la resistència a la insulina, tals com  $\text{TNF}\alpha$  (Kappes i Löffler, 2000), IL-6 (Fasshauer i col, 2003), glucocorticoides (Fasshauer i col, 2002), i agonistes  $\beta$ -adrenèrgics (Delporte i col, 2002). D'altra banda els únics estímuls per l'expressió d'adiponectina coneguts fins al moment són les tiazolidindiones (TZDs), activadors farmacològics de  $\text{PPAR}\gamma$  (Maeda i col, 2001). Així doncs, el paper de la insulina en la regulació de l'adiponectina és encara un tema de controvèrsia: sembla que una estimulació a curt termini incrementa la secreció d'adiponectina (Scherer i col, 1995), mentre que els efectes d'una estimulació a llarg termini no són del tot clars, ja que s'han descrit tant increment (Halleux i col, 2001) com disminució de la seva expressió (Fasshauer i col, 2002).

L'adiponectina també té efectes antiinflamatoris i antiaterogènics. La hipoadiponectinèmia està clínicament correlacionada amb marcadors d'inflamació i amb factors de risc aterogènics, tals com els alts nivells de proteïna C reactiva, nivells alts de TAGs circulants i nivells baixos de colesterol HDL. Els estudis més recents proposen també la implicació de l'adiponectina en la regulació central del consum d'energia i el pes corporal (Qi i col, 2004), l'angiogènesi (Shibata i col, 2004), el risc de càncer de pit i d'endometri (Mantzoros i col, 2004), la producció d'òxid nítric (Chen i col, 2003) i el control de la pressió sanguínia (Iwashima i col, 2004).

### 3.3.3. Leptina

Tal i com s'ha dit anteriorment en aquest treball (apartat 1.2.1.2.1) la leptina és una hormona clau en el control de la ingesta. La leptina es sintetitza majoritàriament en adipòcits de forma directament proporcional a la massa de TAB i l'estat nutricional, secretant-se quantitats majors en TAB subcutani que en el visceral (Wajchenberg, 2000). L'expressió i la secreció de leptina està regulada per gran varietat de factors. Així doncs, la leptina incrementa per acció de la insulina, els glucocorticoides,  $\text{TNF}\alpha$ , estrògens,  $\text{C/EBP}\alpha$  i disminueix amb l'activitat  $\beta_3$ -adrenèrgica, els andrògens, els àcids grassos, la hormona del creixement (GH) i els agonistes de  $\text{PPAR}\gamma$  (Margetic i col, 2002). El seu receptor, s'expressa tant a nivell de SNC com en la perifèria (Bjorbaek i Kahn, 2004).

Els efectes més rellevants són sobre la homeòstasi energètica. La majoria d'aquests efectes, sobretot sobre la ingesta o la despesa energètica, es realitzen a nivell hipotalàmic, mentre que d'altres es produeixen directament sobre els teixits perifèrics (el múscul o el pàncrees) (Bjorbaek i Kahn, 2004). Tot i que inicialment es va considerar com una hormona antiobesitat, el seu principal paper és el de senyal metabòlica de suficiència energètica més que no pas d'excés (Flier, 1998). Els nivells de leptina disminueixen ràpidament durant la restricció calòrica i la pèrdua de pes. La davallada de leptina provoca gana i disminució de la

despesa energètica com a conseqüència de la restricció. La mateixa resposta s'observa en casos de ratolins i humans amb deficiència de leptina, tot i que presentin una obesitat severa. A més, aquesta resposta es normalitza ràpidament, amb la administració de leptina a baixes dosis. En canvi, però, les formes més comuns d'obesitat presenten nivells de leptina circulants elevats, i el seu tractament amb leptina exògena no millora l'obesitat. Per tant, potser la obesitat en aquest cas és resultat d'un problema de resistència a la leptina, ja sigui a nivell de senyalització o de transport a través de la barrera hematoencefàlica (Flier, 2004).

A més dels efectes sobre l'homeòstasi energètica, la leptina intervé en nombrosos processos fisiològics, així com la reproducció (Chehab i col, 1996), l'hematopoesi (Gainsford i col, 1996), l'angiogènesi (Bouloumie i col, 1998), la resposta immunitària (Lord i col, 1998), el control de la pressió sanguínia (Frühbeck, 1999), i la formació òssia (Ducy i col, 2000).

### 3.4. APOPTOSI

#### 3.4.1 DEFINICIÓ D'APOPTOSI

L'apoptosi es pot definir com el conjunt de reaccions bioquímiques que tenen lloc a la cèl·lula i que la condueixen a la mort de forma ordenada i silenciosa. L'apoptosi s'esdevé per activació d'un mecanisme de suïcidi cel·lular, molt conservat evolutivament, i dirigit fonamentalment a eliminar les cèl·lules supèrflues, velles o danyades en els organismes multicel·lulars (Steller, 1995; Jacobson i col., 1997). El procés d'apoptosi participa en esdeveniments fisiològics tals com l'homeòstasi normal dels teixits, el desenvolupament embriogènic i la resposta immunològica. Així, un excés d'apoptosi pot conduir a alteracions en el desenvolupament i a l'aparició de malalties neurodegeneratives, mentre que les deficiències poden portar a malalties autoimmunitàries i a la formació de tumors per increment del nombre de cèl·lules (Thompson, 1995).

#### 3.4.2. CANVIS A LES CÈL·LULES DURANT L'APOPTOSI

Durant el procés d'apoptosi a la cèl·lula es produeixen una sèrie de canvis, tant a nivell morfològic com bioquímic:

*Canvis morfològics:* Les cèl·lules apoptòtiques presenten un patró d'alteracions morfològiques característic (Figura 7). En primer lloc, la cèl·lula es contrau i perd els contactes intercel·lulars (pèrdua d'adhesió). Posteriorment, el citosol i la cromatina es condensen i la cèl·lula s'encongeix (condensació). La cromatina, que tendeix a marginar-se en forma de mitja lluna contra l'embolcall nuclear, es fragmenta i, seguidament, el nucli i la cèl·lula es trenquen en diverses vesícules anomenades cossos apoptòtics (fragmentació).

Aquests cossos apoptòtics són ràpidament fagocitats i digerits per cèl·lules fagocítiques. El fet que la membrana plasmàtica es mantingui íntegra durant tot el procés d'apoptosi és de vital importància pels organismes, ja que d'aquesta manera s'evita l'abocament del material cel·lular a l'espai intercel·lular, que provocaria una reacció inflamatòria (Savill i Fadok, 2000).

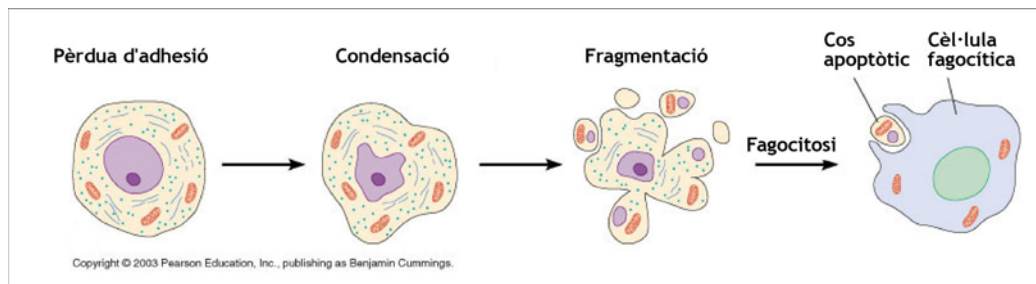


Figura 7. Canvis morfològics que sofreix la cèl·lula en apoptosi.

*Canvis bioquímics:* Les cèl·lules que entren en apoptosi, paral·lelament als canvis morfològics, pateixen una sèrie de canvis a nivell bioquímic. Hi ha una degradació del DNA genòmic en fragments internucleosomals múltiples de 180 pb (Montague i Cidlowski, 1996), una pèrdua del potencial de membrana mitocondrial i de l'asimetria en la composició de la membrana plasmàtica. Durant l'apoptosi els fosfolípids de fosfatidil serina, que habitualment es troben de manera exclusiva a la bicapa lipídica interna de la cèl·lula, queden exposats també a la bicapa externa (Fadok i col., 1992).

### 3.4.3. FASES DE L'APOPTOSI

El procés d'apoptosi pot dividir-se en tres etapes que inclouen una fase d'inducció, que és heterogènia i depèn de l'estímul inductor de mort, una fase efectora durant la qual la cèl·lula activa els mecanismes per viure o morir i una fase comuna de degradació en que la cèl·lula manifesta els canvis bioquímics i morfològics característics de les etapes finals de l'apoptosi.

*Fase d'iniciació:* Els factors inductors d'apoptosi entren en contacte amb la cèl·lula, i depenent de la naturalesa de cada estímul, desencadenen diferents respostes intracel·lulars que transmeten el senyal a la maquinària apoptòtica mitjançant canvis en la seva expressió o estat d'activació. S'han definit dos mecanismes principals d'iniciació de l'apoptosi: els receptors de mort i el dany cel·lular (estrès, radiació, etc.).

*Fase efectora:* Un cop s'han integrat els estímuls, existeix un punt, a partir del qual, el procés és irreversible, i la cèl·lula desencadena els mecanismes que la duren a la mort

cel·lular. Aquest punt de no retorn es dona quan s'activen, en forma de cascada, les caspases (proteases encarregades de l'execució del procés d'apoptosi mitjançant la degradació de diferents substrats cel·lulars). Aquest és el punt de convergència de gairebé tots els senyals inductors d'apoptosi.

*Fase de destrucció:* En aquesta fase, quan tota la maquinària efectora de la mort ja està activada, la cèl·lula perd la seva integritat i presenta la morfologia i els canvis bioquímics típics de l'apoptosi.

### 3.4.4. VIES DE L'APOPTOSI

En mamífers s'han descrit dues vies principals d'apoptosi, que requereixen diferents caspases iniciadores, però que convergeixen a nivell de les caspases efectores activades. Una és la iniciada per l'activació dels receptors de superfície anomenats "receptors de la mort" (Strasser i col., 2000; Ashkenazi, 2002) i l'altra, és la induïda per diferents situacions d'estrès cel·lular, com una inadequada aportació de citocines o dany intracel·lular, que induirà la sortida de factors apoptòtics de dins del mitocondri, i on tenen molta importància els membres de la família de Bcl-2, que són anomenats "els guardians de la integritat mitocondrial" (Green i Reed, 1998; Cory i Adams, 2002).

#### 3.4.4.1. Via extrínseca d'apoptosi o dels receptors de la mort.

La via dels receptors de la mort, o via extrínseca d'apoptosi, s'inicia per la unió de lligands de la superfamília de TNF (TNF $\alpha$ , CD95L/FasL, TWEAK i TRAIL), als seus receptors de superfície cel·lular (TNFR, CD95/Fas, DR3/Apo2 i DR4/5 respectivament). La unió d'aquests lligands induïx l'agregació i activació dels receptors. La via apoptòtica desencadenada per l'activació dels receptors de la mort, provoca la formació del complex de senyalització inductor de mort, anomenat DISC (death-inducing signaling complex). Aquest complex DISC està format per la unió de les proteïnes adaptadores FADD (Fas-associated death domain) i TRADD (TNFR1-associated death domain protein) mitjançant el seu domini de mort, DD (death domain), als DD de la regió citoplasmàtica dels receptors. Mitjançant interaccions homotípiques dels dominis efectors de mort, DED (death effector domain), les proteïnes adaptadores provoquen el reclutament i activació de la procaspasa 8 (Marsden i Strasser, 2003). La proximitat dels zimògens provoca la seva dimerització i autocatàlisi, procés que implica l'activació de la caspasa-8. Un cop activada la caspasa-8, s'activen les caspases efectores (Figura 8).

La senyalització a través dels receptors de la mort pot ser inhibida per les proteïnes cel·lulars i virals anomenades FLIPs (FLICE-inhibitori proteins), que són molècules semblants

a la caspasa-8 o a dos dominis DED on es perd el lloc actiu, que és un residu crític per la seva funció. Les FLIPs, de les quals s'han descrit dues isoformes, FLIP<sub>L</sub> i FLIP<sub>S</sub>, són reclutades al complex DISC i eviten l'activació i l'alliberament de la caspasa-8.

#### 3.4.4.2. Via intrínseca d'apoptosi o via mitocondrial.

La via mitocondrial d'apoptosi, o via intrínseca, es desencadena en resposta a una gran varietat de situacions d'estrès, tant internes com externes, com poden ser la retirada de factors del medi, presència d'agents tòxics, dany al DNA, radiacions, agents oxidants o activació d'oncogens, entre d'altres. En l'apoptosi activada per les diferents situacions d'estrès es modifiquen diversos components cel·lulars, que actuen com a sensors del dany o alteració i inicien la cascada apoptòtica, induint la perforació de la membrana mitocondrial externa i afavorint l'alliberament del citocrom c i altres molècules proapoptòtiques de dins el mitocondri. El citocrom c, component fonamental de la fosforilació oxidativa i de la formació d'ATP, un cop al citoplasma, s'unirà als dominis autoinhibitoris (dominis WD) de la proteïna Apaf-1, (*apoptotic protease activating factor*) activant-la i provocant-li un canvi conformacional que fa que es formi un oligòmer depenent d'ATP, possibilitant així el reclutament i l'activació del proenzim de la caspasa 9, via el domini homòleg de reclutament CARD (*caspase activation and recruitment domain*). El resultat de la interacció de les tres proteïnes, és la formació d'un complex heptamèric de gran mida (d'aproximadament 1 MDa), anomenat apoptosoma, on la caspasa 9 s'activa per canvis al·lostèrics i per dimerització (Acehan i col., 2002; Rodriguez i Lazebnik, 1999). Un cop activada la caspasa 9, aquesta processa les caspases-3 i -7, que inicien la proteòlisi dels diferents substrats cel·lulars. Les cèl·lules deficientes en citocrom c (Li i col, 2000), Apaf-1 (Yoshida i col, 1998) o caspasa 9 (Kuida i col., 1998), presenten defectes en l'activació de l'apoptosi en resposta a senyals interns.

Fins ara tots els processos apoptòtics induïts per estrès eren atribuïts a l'activació de la caspasa 9, però avui en dia, es coneix que altres caspases iniciadores poden participar-hi. Els membres de la família de Bcl-2, dels quals en parlarem amb més detall més endavant, són els encarregats de controlar aquesta via de mort (Figura 8).

L'apoptosi desencadenada per l'activació dels receptors de la mort, i la via mitocondrial controlada pels membres de la família de Bcl-2, estan connectades a través del membre proapoptòtic Bid (Li i col, 1998b; Danial i Korsmeyer, 2004), que pertany al subgrup "BH3-only", dins de la gran família de Bcl-2. La inducció de la via extrínseca de mort induïx l'activació de la caspasa 8, que és capaç de provocar la proteòlisi de Bid, generant

una forma truncada (tBid), que pot translocar al mitocondri i induir la sortida del citocrom c, amplificant la cascada apoptòtica.

Les cèl·lules es poden classificar segons les vies apoptòtiques activades en l'estimulació dels receptors de la mort. En les cèl·lules de tipus I, el processament de la caspasa 8 és suficient per activar la cascada de caspases i desencadenar el procés de mort, independentment de la via mitocondrial i dels membres de la família de Bcl-2. En les cèl·lules tipus II, l'activació de les caspases efectores depèn de la translocació de Bid al mitocondri i de l'activació de la via intrínseca.

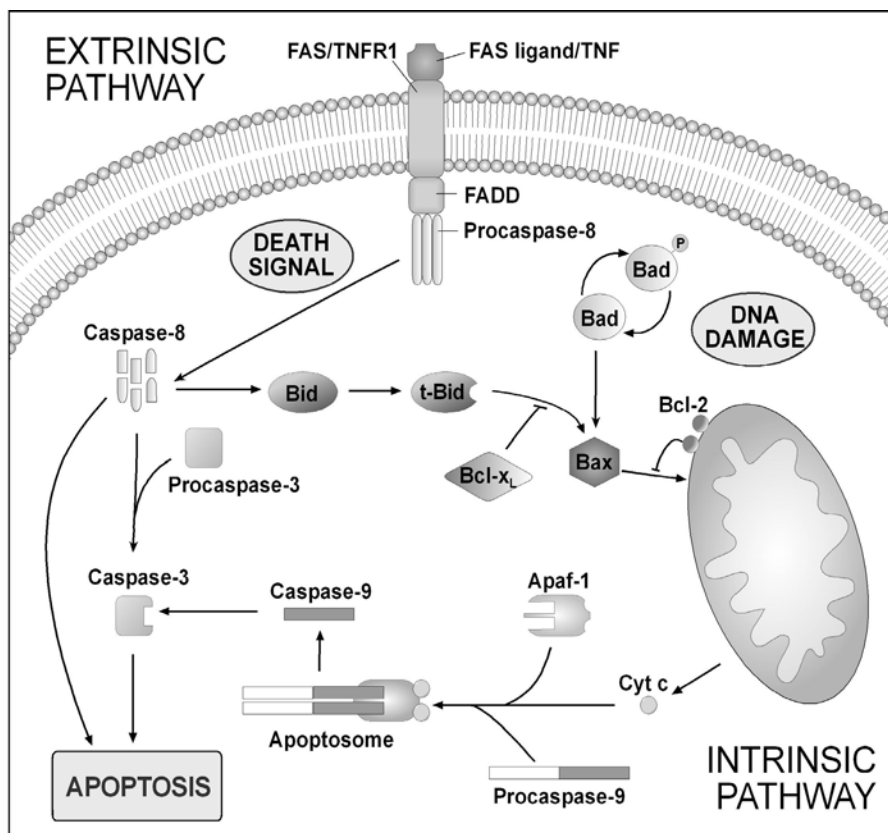


Figura 8: Principals vies d'activació de l'apoptosi

#### 3.4.4.3. Altres vies de mort: la via del reticle endoplàsmic.

A la cèl·lula hi ha altres orgànuls, a més del mitocondri, capaços d'integrar els senyals de mort, com el reticle endoplàsmic, l'embolcall nuclear, els lisosomes i l'aparell de Golgi. Aquests orgànuls tenen sensors per detectar alteracions específiques que induiran diferents senyals per permeabilitzar la membrana mitocondrial o activar les caspases, per tal d'amplificar el procés d'apoptosi (Ferri i Kroemer, 2001). Cada vegada més, s'està implicant



el reticle endoplàsmic com un orgàdul important en el control de l'apoptosi. En la seva membrana s'han trobat tant membres antiapoptòtics com proapoptòtics de la família de Bcl-2. Les diferents situacions d'estrès al reticle indueixen canvis conformacionals i l'oligomerització dels membres Bax i/o Bak, i l'activació de la caspasa 12 (Zong i col, 2003). Una alteració a la funcionalitat del reticle endoplàsmic o un mal plegament de proteïnes, o bé si aquest és insuficient, fa que s'iniciï una resposta d'estrès per intentar reparar la disfunció. Si aquesta no és restaurada i el dany és irreparable, s'iniciarà el procés apoptòtic. També, la mobilització dels dipòsits de calci poden sensibilitzar els mitocondris als senyals apoptòtics (Brekenridge i col, 2003).

Els últims descobriments sobre l'activació i control de les caspases han fet variar alguns dels axiomes que es creien inamovibles, ja que s'han trobat casos d'apoptosi induïda per estrès o induïda pels receptors de la mort, on les caspases poden ser activades per damunt, o independentment del mitocondri. Per tant, la pertorbació del mitocondri, podria ser en alguns casos, només el cop de gràcia necessari per destruir una cèl·lula que ja té determinat el seu destí en la via de la mort cel·lular (Cory i col, 2003).

#### 3.4.4.4. Apoptosi independent de l'activació de les caspases.

S'han identificat dos factors que poden ser mitjancers potencials d'alguns tipus d'apoptosi sense la necessitat d'activació de les caspases. Aquests factors són AIF (Factor inductor d'apoptosi) (Susin i col, 1999) i l'endonucleasa-G (Li i col, 2001). Sembla que els dos factors són capaços d'induir els canvis apoptòtics en el nucli, com és la fragmentació del DNA, però cap dels dos és capaç d'induir la resta de canvis morfològics i bioquímics característics de l'apoptosi. Encara no està molt clara la importància d'aquests dos factors en el procés d'apoptosi.

#### 3.4.5. LA FAMÍLIA DE BCL-2

El fet que una cèl·lula hagi de morir o sobreviure està determinat en part per la família de proteïnes de Bcl-2, que conté tant proteïnes antiapoptòtiques com proapoptòtiques. Aquests reguladors de l'apoptosi responen a estímuls cel·lulars molt variats, ja siguin diferents condicions d'estrès cel·lular, dany al DNA o la pèrdua de citocines i factors de creixement de l'entorn cel·lular, per posar alguns exemples. Els membres antiapoptòtics i proapoptòtics d'aquesta família interaccionen els uns amb els altres, afectant l'organització estructural de diferents orgànuls cel·lulars, per determinar si s'ha de desencadenar la cascada proteolítica de caspases que conduirà la cèl·lula a la mort. Els diferents membres de la família també poden afectar la regulació del cicle cel·lular, i per tant

al desenvolupament dels tumors, funcionant com a gens supressors de tumors o com oncoproteïnes.

La identificació del gen *ced-9* en el nemàtode *C. elegans* va ser el punt de partida del que una dècada més tard seria la família de Bcl-2. El primer gen descobert de la família, el que li dóna el nom, va ser *bcl-2*, aïllat en la translocació cromosòmica t(14;18) en pacients de limfoma fol·licular, translocació que porta el gen sota control del locus de la cadena pesada de les immunoglobulines (Tsujimoto i col, 1984a). A diferència d'altres oncogens identificats, es va veure que Bcl-2 era capaç de promoure la supervivència cel·lular més que induir-ne la proliferació (Vaux i col, 1988). Actualment sabem que, la família de Bcl-2 està formada per almenys 20 membres, que comparteixen uns dominis homòlegs anomenats BH (de Bcl-2 homology), que permeten als diferents membres interaccionar entre ells, per tal d'integrar els diferents senyals cel·lulars que han d'activar l'apoptosi o les vies de supervivència (Cory i Adams, 2002).

Els membres de la família de Bcl-2 poden classificar-se segons la seva funció i els seus dominis estructurals en (Figura 9):

- Membres antiapoptòtics com Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, A1 (Bfl-1), Bcl-w i Boo, que exerceixen una activitat inhibidora de la mort, presenten els quatre dominis d'homologia de Bcl-2 (BH1 a BH4).
- Membres proapoptòtics com Bax, Bak, Mtd/Bok, Bcl-xs, Bad, Diva, Bid, Bik, Bim, Hrk (DP5), Blk, Bnip3 i Bnip3L, que exerceixen una activitat inductora de la mort i poden ser classificats en dues subfamílies en funció dels dominis d'homologia que presenten. La subfamília multidomini està formada pels membres que presenten BH1, BH2 i BH3, mentre que la subfamília BH3-only, inclou aquells que només mantenen el domini BH3.

Amb l'excepció de Bad i Bid, tots els membres de la família presenten el domini transmembrana carboxiterminal (Kelekar i Thompson, 1998; Tsujimoto i Shimizu, 2000).

La majoria dels membres antiapoptòtics (com Bcl-2) i proapoptòtics multidomini (com Bax), i alguns dels BH3-only, a l'extrem carboxiterminal de les seves proteïnes es troba una seqüència hidrofòbica de 16-19 residus, que és un domini transmembrana (TM), important pel seu direccionament cap a diferents membranes intracel·lulars. Estudis de localització en cèl·lules sanes col·loquen a Bcl-2 a les membranes del mitocondri, de l'embolcall nuclear i del reticle endoplàsmic, a Bcl-XL i Bcl-W principalment al mitocondri (Monaghan i col, 1992; Krajewski i col., 1993; Lithgow i col., 1994), mentre que els altres membres antiapoptòtics es solen trobar a la fracció citosòlica (Hsu i col, 1997). Els membres proapoptòtics també

difereixen en la seva localització; Bak es troba associat a les membranes del reticle endoplàsmic i del mitocondri, i Bax sembla ser majoritàriament citosòlic (Wolter i col, 1997).

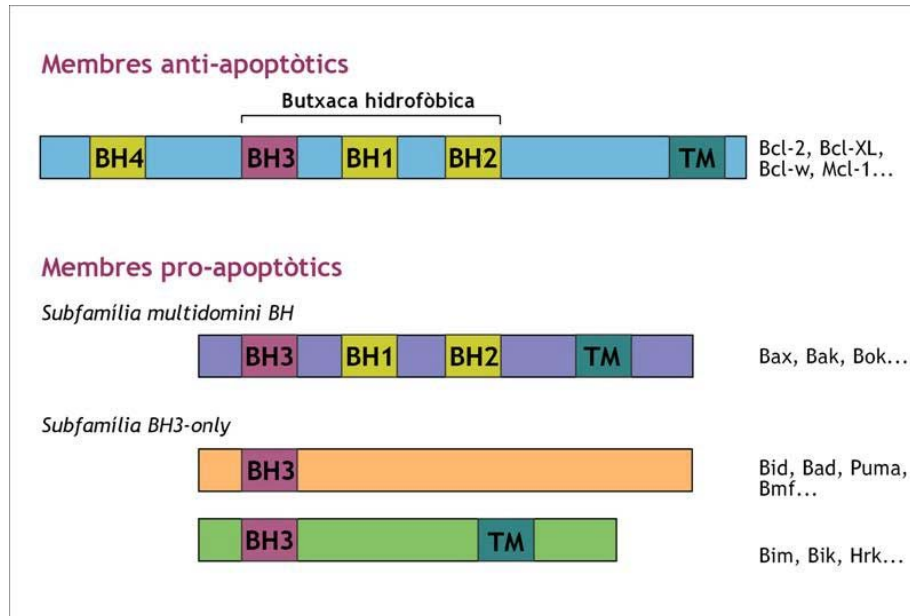


Figura 9. Classificació dels membres de la família de Bcl-2 segons la seva funció i els seus dominis d'organització. Es mostra l'estructura general de la proteïna i es marquen els dominis d'homologia de Bcl-2 (BH) i els dominis transmembrana (TM)(Bras i col, 2004).

### 3.4.6. LES CASPASES

El grup de Yuan va demostrar que l'enzim convertidor d'interleucina-1 $\beta$  (ICE) o caspasa 1, la proteasa que promovia la inflamació al processar la IL-1 $\beta$ , activada artificialment, era capaç d'induir la mort cel·lular. Ara se sap que la ICE no està involucrada en processos d'apoptosi, sinó en inflamació (Cerretti i col, 1992). Aquests descobriments van iniciar la recerca dels membres de la família de proteases relacionades amb ICE, que avui dia coneixem com la família de les caspases (de cisteïna-aspartat-proteases), nomenclatura acordada al 1996, i enumerades segons l'ordre cronològic de clonatge. S'han identificat 14 caspases a mamífers (11 caspases en humans, i les caspases 11, 12 i 14 només en ratolí), 6 caspases a *Drosophila* i 6 a *C. elegans*. Els membres de la família de caspases a mamífers es classifiquen en tres grups, segons si tenen una funció o no en apoptosi i en quina ruta estan implicades. Així un grup de caspases que no estan implicades en apoptosi i que contribueixen al procés inflamatori està format per la caspasa 1, 4, 5, 11, 13, 14. En quan a les caspases implicades en apoptosi tenim un grup de caspases iniciadores implicades en la

fase d'iniciació del procés apoptòtic, que consta de 6 membres: caspasa 2, 8, 9, 10, 12; i el grup de caspases efectores o executores, entre les que destaquen la caspasa 2, 3, 6, 7, 8.

Les caspases són cistein proteases que poden ser processades en posicions situades després de residus d'aspàrtic (Thornberry i Lazebnik, 1998). L'activació de les caspases és un fenomen altament regulat, per evitar que la cèl·lula entri en apoptosi de manera inespecífica. Per tal de regular la seva activació, aquestes són expressades en forma de zimògens, que són formes precursoras inactives.

- Les caspases iniciadores (com la caspasa 8 o la 9) són les primeres en activar-se després de rebre l'estímul apoptòtic. Es caracteritzen, a diferència de les caspases executores, per tenir un llarg pro-domini a la part aminoterminal. L'activació d'aquestes es dona per la dimerització de les formes zimògenes mitjançant l'ajut de proteïnes adaptadores.
- Abans que les caspases executores (caspasa 3, 6 i 7) puguin atacar els seus substrats cel·lulars, les seves formes precursoras inactives han de ser proteolíticament clivellades per una de les caspases iniciadores.

Un altre nivell de regulació de la seva activació és el que fan les proteïnes de la família de les IAPs (proteïnes inhibidores d'apoptosi), que són capaces d'unir-se a les caspases i evitar-ne la seva activació.

### 3.4.7. APOPTOSI I TAB

Segons la hipòtesi de la mida crítica de l'adipòcit, quan aquest arriba a una mida màxima, l'increment de teixit adipós implica un increment en el nombre de cèl·lules (adipogènesi). Fins fa poc temps encara es creia que l'adipogènesi es donava al llarg de tota la vida, de manera que una pèrdua de pes només provocava una reducció de la mida de l'adipòcit, sense afectar mai el nombre de cèl·lules del teixit adipós adult (Ailhaud i col, 1991). D'altra banda, es feia difícil creure que, donada la relativa estabilitat del pes de la massa grassa al llarg del temps, l'adquisició d'adipòcits no es veiés compensada per un procés que inclogués l'eliminació de cèl·lules.

Tot i que encara ara es tracta d'un tema controvèrsia entre la comunitat científica dedicada a l'estudi del teixit adipós, hi ha nombrosos estudis que proposen la inducció d'apoptosi com a mecanisme per disminuir la massa del teixit adipós. En aquest sentit, s'entén l'apoptosi com un procés fisiològic pel qual s'eliminen de manera ràpida i eficient, cèl·lules seleccionades a través de l'activació, induïda per un senyal, d'un procés endogen d'autodestrucció cel·lular. Tot i que l'apoptosi en adipòcits s'ha observat en pacients amb

tumors cancerosos (Prins i col,1994a), actualment sembla que l'apoptosi en adipòcits succeeix en condicions fisiològiques normals.

Cultius *in vitro* demostren com els preadipòcits i adipòcits humans desencadenen una resposta apoptòtica a  $TNF\alpha$  o a la careència de sèrum (Prins i col, 1994b; Prins i col, 1997). Donat que  $TNF\alpha$  indueix una pèrdua de pes, i que en casos de pacients de càncer els seus nivells plasmàtics són alts, es pot deduir que el mecanisme pel que aconseguix reduir el pes tant ràpidament en aquests pacients, no implica només un increment en la taxa lipolítica dels adipòcits sinó també una deleció per apoptosi (Prins i col, 1994a). A més es sap que  $TNF\alpha$  indueix, mentre que la insulina inhibeix, l'apoptosi d'adipòcits de rata en cultiu dependent de caspasa 3 (Qian i col, 2001). Recentment, també s'han estudiat els efectes d'alguns productes naturals sobre l'apoptosi en cèl·lules adiposes en cultiu, demostrant així la presència d'aquest mecanisme en el sistema *in vitro* (Nelson i Dooley, 2005). En aquesta línia també, Lin i col. publiquen aquest mateix any un treball en que s'estudia els efectes de les catequines del te verd (amb propietats aprimadores i inhibidores del creixement de diversos tipus de cèl·lules carcinogèniques per apoptosi) sobre els adipòcits 3T3-L1, demostrant també una inducció apoptòtica dels adipòcits en cultiu alhora que s'inhibeix l'adipogènesi (Lin i col, 2005).

Pel que fa *in vivo*, nombroses molècules són capaces d'induir apoptosi en teixit adipós blanc. La més reconeguda i estudiada ha estat la leptina. L'administració intracerebroventricular (ICV) de leptina provoca l'activació de processos apoptòtics a nivell de teixit adipós blanc, a més d'incrementar-ne la lipòlisi (Qian i col, 1998a). Després de 4 dies del tractament amb leptina, les rates estudiades presentaven un 80-85% de reducció de la massa de teixit adipós blanc i una disminució significativa del contingut de DNA (-64%). Es trobava també característiques d'apoptosi en les cèl·lules adiposes tals com DNA laddering o TUNEL (Terminal dUTP Nick-End-Labeling).

El tractament amb leptina causa un increment del 70-80% de l'expressió de  $PPAR\gamma$  en el TAB epididimal però una disminució (-40%) de  $TNF\alpha$  en rates joves (Qian i col, 1998a). És per això que s'ha postulat que els efectes apoptòtics de la leptina estiguin mediat per  $PPAR\gamma$ , mentre que els nivells de  $TNF\alpha$  siguin un efecte secundari de la pèrdua de massa grassa. Una correlació positiva entre  $PPAR\gamma$  i apoptosi s'ha trobat en cèl·lules canceroses tractades amb troglitazona i en TAB de rosegadors tractats amb tiazolidindiones (TZD) (Yamauchi i col, 2001). L'activació de  $PPAR\gamma$  estimula apoptosi en gran varietat de tipus cel·lulars (Nunez i col, 2005; Chen i col, 2005; Bishop-Bailey i col, 1999). També es coneix que els seus lligands (prostaglandines, àcids grassos i TZD) són inductors d'apoptosi. En rates obesas Zucker, el tractament amb troglitazona incrementa els adipòcits de mida reduïda mentre que disminueix es adipòcits més grans (Okuno i col, 1998). Totes aquestes

dades donen consistència a la hipòtesi que PPAR $\gamma$ , com d'altres possibles factors de transcripció, tingui entre els seus múltiples efectes, la inducció de l'apoptosi en resposta a algunes circumstàncies cel·lulars.

Altres estudis atorguen també un paper rellevant als factors de transcripció C/EBPs i NF $\kappa$ B. El tractament amb leptina ICV disminueix l'expressió de C/EBP $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  en TAB epididimal (Qian i col, 1998). Els C/EBPs són importants reguladors de l'expressió gènica dels adipòcits i de la seva diferenciació. Una disminució amb el tractament amb leptina podria causar una inhibició del creixement dels adipòcits i eventualment apoptosi adipocitària. NF $\kappa$ B és un factor de transcripció que juga un paper fonamental en la via de regulació de la promoció d'apoptosi o creixement, regulant gran nombre de gens cel·lulars. La seva activació pot iniciar processos apoptòtics (Hsu i col, 1996; Abbadie i col, 1993), tot i que també pot regular gens que suprimeixen apoptosi (Wu i col, 1996; Mayo i col, 1997). En aquest cas el tractament amb leptina augmenta la seva expressió, suggerint doncs una participació en el mecanisme d'acció de la inducció d'apoptosi per la leptina.

El tractament oral amb tungstat (compost estudiat pel tractament de la diabetis i l'obesitat) de rates amb obesitat induïda per la dieta, incrementa el nombre d'adipòcits de mida petita alhora que els indueix apoptosi (Claret i col, 2005). També s'ha aconseguit induir apoptosi *in vivo* en teixit adipós amb el factor ciliar neurotròfic (CNTF), amb agonistes  $\beta$ -adrenèrgics o amb àcid linoleic conjugat (CLA) en ratolins (Nelson-Dooley, 2005). Suplements de vitamina A en rates amb normopès de la soca WNIN/Ob indueix una pèrdua de pes mitjançada per fenòmens apoptòtics segons els darrers estudis publicats (Jeyakumar i col, 2005).

Donades les diferències regionals observades entre els diferents dipòsits de TAB, també s'ha buscat diferències a nivell de resposta apoptòtica. Així, estudis realitzats en adipòcits i pre-adipòcits humans en cultiu, demostren que existeixen diferents susceptibilitats a la inducció d'apoptosi. Hi ha evidències que el teixit adipós omental té una taxa de replicació superior a la que presenten els dipòsits subcutanis (Pettersson i col, 1985), i que en canvi aquests últims responen més ràpidament a la diferenciació amb TZD que en el cas de les localitzacions omentals (Adams i col, 1997). Pel que fa al metabolisme, *in vivo*, els adipòcits omentals tenen una taxa de recanvi de lípids més alta que les cèl·lules subcutànies (Mârin i col, 1996; Martin i col, 1991). *In vitro*, els adipòcits aïllats dels dipòsits omentals tenen nivells basals d'AMPc superiors, una alta sensibilitat a l'efecte lipolític de les catecolamines i una menor susceptibilitat als efectes antilipolítics de la insulina (Lafontan i Berlan, 2003). La inducció d'apoptosi per TNF $\alpha$  o la manca de sèrum és més eficient en el cas dels preadipòcits que provenen del dipòsit omental que no pas del subcutani (Niesler i col, 1998). Així doncs, la diferent susceptibilitat a la inducció d'apoptosi concorda amb la

idea que el teixit adipós visceral és una teixit metabòlicament més actiu i per tant es perdrà preferencialment en resposta a una situació que comporti una pèrdua de pes.

S'ha vist que moltes de les molècules estudiades per reduir la massa de teixit adipós, aconsegueixen els seus efectes, junt amb d'altres mecanismes, mitjançant la inducció d'apoptosi en adipòcits. Per això s'ha plantejat l'estudi de les vies apoptòtiques en l'adipòcit com un camp de treball per tal de trobar nous fàrmacs per l'obesitat o inclús per l'osteoporosi (Nelson-Dooley, 2005).

### 3.5. L'ADIPÒCIT COM A MODEL

En els darrers anys s'han destinat molts recursos en l'estudi de l'adipòcit per tal d'afrontar patologies amb tanta incidència com són la obesitat i la resistència a la insulina. El descobriment de la leptina va desencadenar un gran interès en l'estudi de l'adipòcit i els seus productes.

A més de la realització d'estudis *in vivo* que permeten esbrinar aspectes sobre les relacions dels adipòcits amb altres òrgans i teixits, ha estat gràcies als models cel·lulars *in vitro* que s'ha pogut estudiar altres aspectes propis de la cèl·lula adiposa. En aquest sentit els models *in vitro* han estat molt útils per l'estudi dels processos moleculars i cel·lulars implicats en la diferenciació dels precursors adipocitaris fins a esdevenir adipòcits madurs.

Les línies cel·lulars emprades es poden classificar en tres categories: 1) cèl·lules embrionàries totipotents que poden generar qualsevol línia cel·lular; 2) cèl·lules multipotents que poden donar lloc a miòcits, adipòcits i condriòcits; i 3) cèl·lules unipotents que ja estan compromeses cap a la línia adiposa i que s'anomenen línies cel·lular de preadipòcits. D'altra banda també s'han aconseguit fer cultius primaris a partir de l'aïllament de preadipòcits i diferenciar-los a adipòcits madurs.

Un model àmpliament caracteritzat de diferenciació adipocitària és la línia cel·lular 3T3-L1 (Green i col, 1974). Aquesta línia cel·lular deriva d'un teixit no adipós i es pot convertir en cèl·lules acumuladores de lípids. Durant la fase de creixement no expressa cap marcador estructural ni funcional d'adipòcits, però mostren en canvi propietats de la seva naturalesa de fibroblast no diferenciats (Green i col, 1976). Això vol dir que sintetitzen col·lagen de tipus I i III o que posseeixen una xarxa fibril·lar organitzada de fibronectina i microfilaments ben desenvolupats. El procés de diferenciació succeeix espontàniament després de la inhibició per contacte del creixement quan el cultiu arriba a confluència. A partir d'aleshores les cèl·lules desenvolupen activitats enzimàtiques de síntesi d'àcids grassos, de síntesi de TAGs i d'utilització de lípids exògens (Spooner i col, 1979). El fenotip

canvia a cèl·lules amb la forma arrodonida característica dels adipòcits amb vacuoles multilocular i un nucli localitzat al centre de la cèl·lula.

LÍNIES CEL·LULARS	ORIGEN/ESPÈCIE	INDUCTORS DE DIFERENCIACIÓ	CATEGORIA
ES	Blastòcits/Embrió de ratolí	Àcid retinoic	Totipotent
TA1	Fibroblasts 10 T1/2 tractats amb azacitidina/Embrió de ratolí	10% FBS, insulina, dexametasona	Multipotent
3T3-L1	Fibroblasts/Embrió de ratolí	10% FBS, insulina, dexametasona, IBMX	Unipotent
3T3-F442A	Fibroblasts/Embrió de ratolí	10% FBS, insulina	Unipotent
Ob17	Greix epididimal/Ratolí ob/ob adult	8% FBS, insulina, triiodetironina	Unipotent
CULTIUS PRIMARIS	ORIGEN	INDUCTORS DE DIFERENCIACIÓ	CATEGORIA
Rata	Cèl·lules estromals vasculars de greix subcutani, epididimal i retroperitoneal	Insulina amb o sense FBS	Unipotent
Ratolí	Cèl·lules estromals vasculars de greix subcutani	Insulina, HDL, dexametasona	Unipotent
Porc	Cèl·lules estromals vasculars de greix subcutani i perirenal	Insulina amb o sense glucocorticoides	Unipotent
Humà	Cèl·lules estromals vasculars de greix subcutani i omental	Insulina i glucocorticoides	Unipotent

Taula 1. Models cel·lulars in vitro d'adipòcits: principals línies cel·lulars i cultius primaris utilitzats per l'estudi de la diferenciació adipocitària.

El tractament crònic amb concentracions hiperfisiològiques d'insulina accelera la velocitat i l'eficiència de la conversió a adipòcits (Green i col, 1975). S'han proposat dos mecanismes que expliquen la necessitat d'aquestes altes concentracions : els receptors de superfície de IGF de tipus I tenen baixa afinitat per la insulina o el medi de cultiu té una alta taxa de degradació de la insulina (Rubin i col, 1978). La major part del TAGs acumulats provenen dels àcids grassos lliures sintetitzats (Spooner i col, 1979). L'inhibidor de fosfodiesterasa IBMX (isobutilmetilxantina) estimula la conversió a adipòcits, suggerint així un paper regulador dels nucleòtids cíclics en el control de la diferenciació (Spooner i col, 1979; Russell i col, 1976). També la dexamentasona indueix l'eficiència de la diferenciació adipocitària. És per això que es combinen totes aquestes hormones per tal d'induir la diferenciació un cop les cèl·lules han arribat a la confluència.



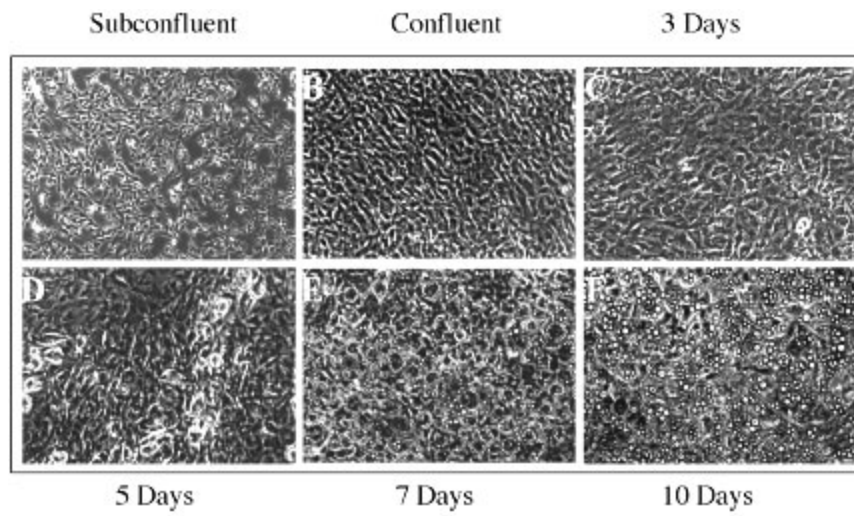


Figura 10. Diferenciació d'adipòcits 3T3-L1 *in vitro*. Microfotografia de contrast de fases de preadipòcits en diferents etapes de diferenciació. (Felmer i Clark, 2004)



## **II. OBJECTIUS**



Inicialment es va plantejar un objectiu molt ambiciós com era la identificació del mecanisme d'acció de l'oleat d'estrona (OE). El nostre grup d'investigació portava ja uns quants anys treballant amb l'OE i especialment en el coneixement dels seus efectes, però encara no teníem massa pistes de com podia funcionar, doncs en ser un producte insoluble en medis aquosos feia molt difícil un apropament convencional per l'estudi del seu mecanisme d'acció.

A partir dels efectes fisiològics dels que teníem coneixement (disminució transitòria de la gana, pèrdua de pes de llarg abast, disminució del contingut de greix total en l'animal, etc.) i juntament a unes dades prèvies on es veia que el tractament amb OE provocava un augment de glicerol en el medi d'adipòcits en cultiu, es va suposar que el mecanisme d'acció implicaria l'activitat lipolítica. Per aquest motiu vam intentar atacar el problema des de dos punts de vista prou diferents, però que poguessin aportar informació complementària: d'una banda el treball en condicions *in vitro*, amb la utilització de cultius cel·lulars (aproximació a la cinètica de captació) i d'altra banda la recerca de canvis significatius en els paràmetres lipídics, i del teixit adipós, en models *in vivo*.

### Primer objectiu

Així, aquest primer objectiu es concreta amb **l'aproximació *in vitro* a l'estudi del mecanisme d'acció de l'OE en l'adipòcit.**

Aquest objectiu es va desenvolupar utilitzant com a model cel·lular les cèl·lules 3T3-L1, que són fibroblasts d'origen murí i que després de ser estimulats correctament es diferencien en adipòcits, doncs expressen la major part dels gens característics del metabolisme del teixit adipós. Així, incubant aquestes cèl·lules en presència d'OE podríem conèixer tant la cinètica de captació, com la seva regulació i finalment com es podria regular el seu alliberament, que ja sabíem que estava condicionat per diferents hormones.

D'aquesta aproximació esperàvem trobar la confirmació de que l'acció de l'OE en el teixit adipós actuava mitjançant un increment de l'activació de la via lipolítica, determinada per l'aparició de glicerol en el medi com a producte terminal o AMPc a l'interior cel·lular.

En els estudis *in vitro* una de les dificultats en que ens varem trobar es la marcada insolubilitat de l'OE en medis aquosos, fet que va implicar treballar utilitzant diferents vehicles que permetessin la seva solubilització, la qual cosa va complicar la interpretació dels resultats. Aquest problema ens va portar al plantejament del segon objectiu.

### Segon objectiu

Aquest segon aspecte del treball podia complementar l'obtingut en la primera part, però de fet era totalment independent d'aquell, ens interessava, doncs, **l'estudi del mecanisme d'acció l'OE a partir de la utilització de models animals, es a dir *in vivo*, determinant aquells efectes que són conseqüència directa i específics de l'OE. Així, aquest objectiu genèric es va desenvolupar en diferents blocs.**

En primer lloc, **ens interessava posar en evidència que els efectes globals de l'OE no son explicables només per la disminució de la ingesta**, per la qual cosa es van estudiar les diferències entre el tractament amb OE i la restricció de la ingesta utilitzant un model *pair-fed*.

Un segon aspecte a concretar més era el temps de resposta a l'administració de l'OE. Fins ara totes les proves i valoracions s'havien fet al final del tractament de 10 a 15 dies, segons fos administració oral o intravenosa, malgrat que hom sabia que la pèrdua de pes i la disminució transitòria de gana començaven tot just iniciat el tractament. Així, doncs ens va interessar **l'estudi dels efectes de l'OE en el tractament a curt termini, concretament a 3, 6, 24 i 48 hores de tractament, que ens permetés determinar aquells efectes més directes i primerencs de l'OE**. En primer lloc es van estudiar els paràmetres plasmàtics típics per tal de determinar on començaven els canvis.

D'aquest plantejament esperàvem trobar que: els efectes de l'OE fossin remarcables a les 48 hores de tractament i a més que fossin clarament diferents dels efectes causats per la manca d'ingesta. Si aconseguíem demostrar això, estàvem en condicions de buscar elements marcadors en teixit adipós que ens permetessin entendre com es podia produir l'efecte.

Així, i tot imaginar-nos que l'activació de la lipòlisi potser no seria la única via per la qual podria actuar l'OE, **vam buscar evidències de l'activació dels mecanismes apoptòtics mitjançant els canvis d'expressió de diferents factors implicats en la via**. De manera paral·lela, també **ens vam interessar en determinar quins gens canviaven amb el tractament amb OE**, i així vam dissenyar fer un cribatge amb més de 1000 gens mitjançant una tècnica d'*arrays*, per a així poder determinar quins eren regulats positivament i quins negativament. En funció dels resultats es va preveure comprovar els canvis en aquells gens que es trobessin implicats en diferents vies metabòliques, i que per tant podrien explicar els canvis metabòlics observats.

De fet el que esperàvem trobar serien dos tipus de canvis, uns que impliquessin un increment de l'activitat lipolítica, a través de l'expressió d'enzims afavoridors d'aquesta via i per l'altre, l'activació de la via apoptòtica.

Si confirmàvem els resultats, hauríem fet un pas endavant per tenir més clar com actua l'OE, malgrat ens quedés encara molt camí per recórrer.





## **II. OBJECTIUS**



Inicialment es va plantejar un objectiu molt ambiciós com era la identificació del mecanisme d'acció de l'oleat d'estrona (OE). El nostre grup d'investigació portava ja uns quants anys treballant amb l'OE i especialment en el coneixement dels seus efectes, però encara no teníem massa pistes de com podia funcionar, doncs en ser un producte insoluble en medis aquosos feia molt difícil un apropament convencional per l'estudi del seu mecanisme d'acció.

A partir dels efectes fisiològics dels que teníem coneixement (disminució transitòria de la gana, pèrdua de pes de llarg abast, disminució del contingut de greix total en l'animal, etc.) i juntament a unes dades prèvies on es veia que el tractament amb OE provocava un augment de glicerol en el medi d'adipòcits en cultiu, es va suposar que el mecanisme d'acció implicaria l'activitat lipolítica. Per aquest motiu vam intentar atacar el problema des de dos punts de vista prou diferents, però que poguessin aportar informació complementària: d'una banda el treball en condicions *in vitro*, amb la utilització de cultius cel·lulars (aproximació a la cinètica de captació) i d'altra banda la recerca de canvis significatius en els paràmetres lipídics, i del teixit adipós, en models *in vivo*.

### Primer objectiu

Així, aquest primer objectiu es concreta amb **l'aproximació *in vitro* a l'estudi del mecanisme d'acció de l'OE en l'adipòcit.**

Aquest objectiu es va desenvolupar utilitzant com a model cel·lular les cèl·lules 3T3-L1, que són fibroblasts d'origen murí i que després de ser estimulats correctament es diferencien en adipòcits, doncs expressen la major part dels gens característics del metabolisme del teixit adipós. Així, incubant aquestes cèl·lules en presència d'OE podríem conèixer tant la cinètica de captació, com la seva regulació i finalment com es podria regular el seu alliberament, que ja sabíem que estava condicionat per diferents hormones.

D'aquesta aproximació esperàvem trobar la confirmació de que l'acció de l'OE en el teixit adipós actuava mitjançant un increment de l'activació de la via lipolítica, determinada per l'aparició de glicerol en el medi com a producte terminal o AMPc a l'interior cel·lular.

En els estudis *in vitro* una de les dificultats en que ens varem trobar es la marcada insolubilitat de l'OE en medis aquosos, fet que va implicar treballar utilitzant diferents vehicles que permetessin la seva solubilització, la qual cosa va complicar la interpretació dels resultats. Aquest problema ens va portar al plantejament del segon objectiu.

### Segon objectiu

Aquest segon aspecte del treball podia complementar l'obtingut en la primera part, però de fet era totalment independent d'aquell, ens interessava, doncs, **l'estudi del mecanisme d'acció l'OE a partir de la utilització de models animals, es a dir *in vivo*, determinant aquells efectes que són conseqüència directa i específics de l'OE. Així, aquest objectiu genèric es va desenvolupar en diferents blocs.**

En primer lloc, **ens interessava posar en evidència que els efectes globals de l'OE no son explicables només per la disminució de la ingesta**, per la qual cosa es van estudiar les diferències entre el tractament amb OE i la restricció de la ingesta utilitzant un model *pair-fed*.

Un segon aspecte a concretar més era el temps de resposta a l'administració de l'OE. Fins ara totes les proves i valoracions s'havien fet al final del tractament de 10 a 15 dies, segons fos administració oral o intravenosa, malgrat que hom sabia que la pèrdua de pes i la disminució transitòria de gana començaven tot just iniciat el tractament. Així, doncs ens va interessar **l'estudi dels efectes de l'OE en el tractament a curt termini, concretament a 3, 6, 24 i 48 hores de tractament, que ens permetés determinar aquells efectes més directes i primerencs de l'OE**. En primer lloc es van estudiar els paràmetres plasmàtics típics per tal de determinar on començaven els canvis.

D'aquest plantejament esperàvem trobar que: els efectes de l'OE fossin remarcables a les 48 hores de tractament i a més que fossin clarament diferents dels efectes causats per la manca d'ingesta. Si aconseguíem demostrar això, estàvem en condicions de buscar elements marcadors en teixit adipós que ens permetessin entendre com es podia produir l'efecte.

Així, i tot imaginar-nos que l'activació de la lipòlisi potser no seria la única via per la qual podria actuar l'OE, **vam buscar evidències de l'activació dels mecanismes apoptòtics mitjançant els canvis d'expressió de diferents factors implicats en la via**. De manera paral·lela, també **ens vam interessar en determinar quins gens canviaven amb el tractament amb OE**, i així vam dissenyar fer un cribatge amb més de 1000 gens mitjançant una tècnica d'*arrays*, per a així poder determinar quins eren regulats positivament i quins negativament. En funció dels resultats es va preveure comprovar els canvis en aquells gens que es trobessin implicats en diferents vies metabòliques, i que per tant podrien explicar els canvis metabòlics observats.

De fet el que esperàvem trobar serien dos tipus de canvis, uns que impliquessin un increment de l'activitat lipolítica, a través de l'expressió d'enzims afavoridors d'aquesta via i per l'altre, l'activació de la via apoptòtica.

Si confirmàvem els resultats, hauríem fet un pas endavant per tenir més clar com actua l'OE, malgrat ens quedés encara molt camí per recórrer.



### **III. MATERIALS I MÈTODES**





## 1. EXPERIMENTS “IN VITRO”

### 1.1. CULTIUS CEL·LULARS.

#### 1.1.1. TÈCNiques GENERALS DE CULTIU CEL·LULAR

El treball amb cultius cel·lulars implica unes condicions d'estricta esterilitat per evitar contaminacions (bacterianes, de llevats, etc.) que s'han de mantenir en tot moment, i que s'aconsegueixen mitjançant unes normes de treball que s'han de seguir amb molta precaució.

Per tal de mantenir la màxima higiene a les nostres mans, abans de començar la manipulació de les cèl·lules s'han de rentar amb aigua i sabó i mullar-les amb etanol. Es treballa amb una campana de flux laminar vertical (ESI), tenint la precaució de netejar les superfícies amb etanol, tant abans de començar com en acabar, i amb un bec de Bunsen que ens serveix per flamejar el material que utilitzem dins la campana. Tot el material que s'utilitza és estèril, en alguns casos garantit de fàbrica, i en d'altres en que no és possible, s'esterilitza mitjançant autoclau. Aquest material, un cop obert l'embalatge que el manté estèril, s'ha de mantenir sempre tancat i dins la sala de cultius abans d'introduir-lo dins la campana, i tot just abans que hi entri es neteja amb etanol. Pel que fa als reactius, en la mesura del possible, han de ser de qualitat per cultius cel·lulars, o bé s'han de filtrar sota campana amb filtres de 0,22 µm de diàmetre de porus (Schleicher & Schuell). Les ampolles de medis de cultiu o de solucions que obrim dins la campana s'han de mantenir prop de la flama del Bunsen, es flameja el coll de l'ampolla i el tap i aquest s'ha de deixar cap per avall al damunt de la superfície de la campana per tal d'evitar contaminacions. A l'hora de treure-les de la campana, i un cop flamejades amb el Bunsen, s'han de segellar amb cinta al voltant del tap. És també important evitar passar les nostres mans o bé material de treball per sobre d'ampolles obertes, plaques de cultiu, o demés material contaminable. Les superfícies de la campana es mantenen estèrils amb la irradiació de raigs UV mentre no està en ús, igual com la sala de cultius durant les nits.

El correcte creixement del cultiu i l'estat de les cèl·lules es monitoritza mitjançant l'observació al microscopi òptic en contrast de fases, controlant també que la morfologia cel·lular és l'esperada.

El cultiu es manté dins un incubador que manté una concentració de CO<sub>2</sub> i temperatura constant, i que requereix un manteniment periòdic i unes condicions de neteja que garanteixin l'esterilitat del seu interior.

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

### 1.1.2. MEDIS DE CULTIU CÈL·LULES 3T3-L1

#### REACTIUS:

- Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) amb 4,5 g/L glucosa i L-glutamina (BioWhittaker Cat. Nº BE12-604F)
- Sèrum boví fetal (FBS): prèviament a la seva utilització s'inactiva escalfant-lo a 56°C durant de 20 minuts. A continuació s'aliquota en tubs estèrils de 50 ml i es guarda a -20°C. (BioWhittaker Cat. Nº 14-801F)
- Sèrum boví (CS): prèviament a la seva utilització s'inactiva escalfant-lo a 56°C durant de 20 minuts. A continuació s'aliquota en tubs estèrils de 50 ml i es guarda a -20°C. (BioWhittaker Cat. Nº 14-401F)
- Penicil·lina / estreptomicina: 10.000 U/ml:10.000 µg/ml. (BioWhittaker 17-602A)
- Àcid 4-[2-hidroxietil]-1-piperazimetà-sulfònic (HEPES) 1,25 M pH 7,4, filtrat sota campana 0,22 µm i guardat a 4°C.
- Tripsina 0.05%-EDTA 0.02% (BioWhittaker 17-161E)
- Dexametasona 0,25mM (Sigma D-2915). Es prepara la solució en aigua, es filtra sota campana i s'aliquota per conservar-la a -20°C.
- Insulina 5 mg/L (Roche 1376497). Es dissol en HCl 5mM i es guarda aliquidat a -20°C. Es filtra en el moment d'utilitzar-la diluïda en una part del medi.
- 1-metil-3-isobutilxantina (IBMX) 0,1M (Sigma Ultra I-7018). Es prepara amb una solució NaOH 100mM en etanol. Es filtra sota campana i s'aliquota per conservar-la a -20°C.

Medi de cultiu de fibroblasts (10% CS)

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

Penicil·lina	100U/ml
Estreptomicina	100µg/ml
Hepes	25mM
CS	10%

Medi de diferenciació 1 (D1)

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

Penicil·lina	100U/ml
Estreptomicina	100µg/ml
Hepes	25mM
FBS	10%
Insulina	5 µg/ml
Dexametasona	0,25 µM
IBMX	0,5 mM

Medi de diferenciació 2 (D2)

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

Penicil·lina	100U/ml
Estreptomicina	100µg/ml
Hepes	25mM
FBS	10%
Insulina	5 µg/ml

Medi de diferenciació 3 (i manteniment de les cèl·lules diferenciades)(10%FBS) (D3)

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

Penicil·lina	100U/ml
Estreptomicina	100µg/ml
Hepes	25mM
FBS	10%

Habitualment es prepara un volum de 500 ml de medi que es conserva a 4°C fins a un màxim de 4-6 setmanes. Els medis s'escalfen a 37°C abans d'afegir-los a les cèl·lules per evitar sotmetre-les a estrès tèrmic.

### 1.1.3. PROTOCOL DE DIVISIÓ O SEMBRA DE SUBCULTIU

Per tal de mantenir aquests fibroblasts en creixement s'ha d'evitar que arribin a estar a una densitat superior a la placa del 80 % de confluència. Per tant, abans que les cèl·lules arribin a aquesta densitat, cal separar-les de la superfície on estan adherides mitjançant l'acció d'una proteasa (tripsina), i sembrar-les de nou més diluïdes (o a menor densitat) en una superfície que els permeti fixar-s'hi i dividir-se. Això és el que es coneix com tripsinització. Un cop arrencades les cèl·lules de la superfície de la placa de cultiu aquestes poden utilitzar-se per obtenir nous fibroblasts i mantenir l'estoc, o bé es poden sembrar en plaques de subcultiu per realitzar els experiments previstos.

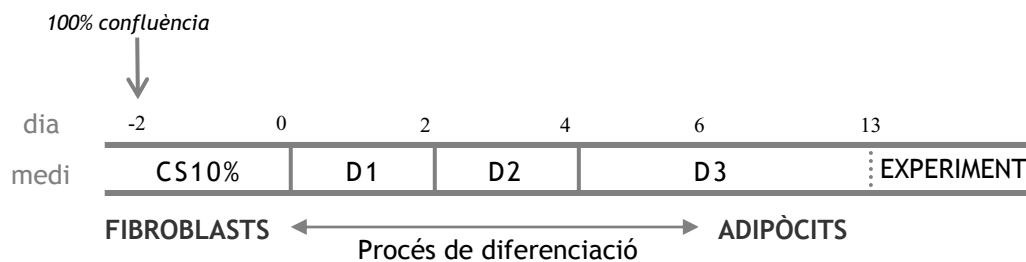
*PROCEDIMENT* (per un flascó de 75 cm<sup>2</sup>):

1. Aspirar amb una pipeta pasteur acoblada a una bomba de buit el medi de cultiu i rentar dues vegades amb PBS.
2. Afegir 1,5 ml de tripsina - EDTA al flascó i deixar que les cèl·lules s'arrenquin controlant-les amb el microscopi per tal que estiguin el mínim temps possible en contacte amb la proteasa per evitar malmetre les cèl·lules.
3. Afegir al flascó entre 7 i 10ml de medi CS 10% i traspasar el volum total del flascó a un tub de plàstic de 15 ml.
4. Centrifugar a 1000 x g durant 2 minuts i retirar-ne el sobrenedant. Resuspendrer el precipitat de cèl·lules en 3ml de medi CS 10% i treure una petita alíquota per estimar el nombre de cèl·lules de què disposem utilitzant un hematocitòmetre o càmera de Neubauer.
5. Un cop sabem la quantitat de cèl·lules que tenim podem diluir el medi en què es troben les cèl·lules per tal d'obtenir el volum adequat per sembrar els flascons i/o plaques que calgui. En el cas que es vulgui, mantenir flascons de fibroblasts per continuar dividint les cèl·lules, es poden sembrar entre 50.000 i 100.000 cèl·lules per flascó de 75 cm<sup>2</sup>. Per sembrar cèl·lules per diferenciar-les a adipòcits, es solen sembrar entre 20.000-25.000 cèl·lules per pou (en plaques de 6 pous) o entre 120.000-150.000 cèl·lules en plaques de 10 cm<sup>2</sup>.
6. Un cop sembrades les cèl·lules en la superfície corresponent és convenient agitar suaument la placa per tal que es reparteixin uniformement.

Els fibroblastes 3T3-L1 poden tripsinitzar-se nombroses vegades, però no és recomanable fer-ho més de 14 o 15 vegades, degut a que van perdent la seva capacitat de diferenciació.

#### 1.1.4. PROTOCOL DE DIFERENCIACIÓ

El protocol de diferenciació de les cèl·lules 3T3-L1 comença dos dies després que els fibroblasts arribin al 100% de confluència a la placa de cultiu. En aquest moment es canvia el medi de cultiu amb CS 10% pel medi D1 (FBS 10% i hormones). Creixeran en aquest medi 48 hores i el substituïrem pel medi D2 (FBS 10% i insulina). Després de 48 hores canviarem el medi per l'últim medi de diferenciació d3, i aquest mateix ens servirà per mantenir els adipòcits un cop diferenciats, que podrem començar a utilitzar per als experiments a partir d'una setmana post-diferenciació.



#### 1.1.5. PROTOCOL DE CONGELACIÓ I DESCONGELACIÓ

Els fibroblasts es mantenen congelats en criotubs dins de tancs de nitrogen líquid durant anys. Per períodes més curts (setmanes o mesos) es poden conservar a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

##### 1.1.5.1 Medi de congelació

Preparar el medi de congelació següent:

- DMEM 25mM glucosa (4,5 g/L) 40%
- Fetal Bovine Serum (FBS) 40%
- Di-metil-sulfòxid (DMSO) 10%

##### 1.1.5.2 Protocol de congelació

Quan ens interessa congelar cèl·lules per emmagatzemar-les durant llargs períodes de temps, es fa en condicions de fibroblasts i es procedeix de la següent manera:

1. Tripsinitzar les cèl·lules que tenim adherides a la placa o flascó (amb una confluència inferior o igual al 80%) i precipitar-les amb una centrifugació a  $1000 \times g$ . Contar el nombre de cèl·lules de què disposem i reprecipitar-les per resuspendrer-les en medi de congelació (que mantenim en gel) a una concentració entre 400.000 i 1.000.000 cèl·lules/ml de medi.

2. Repartir alíquotes d'1ml de cèl·lules en criotubs estèrils i mantenir-los en gel.
3. Embolicar els criotubs dins una caixa de porexpan i deixar-la a  $-80^{\circ}\text{C}$  durant 24 hores i finalment passar-los al tanc de nitrogen líquid, o bé utilitzar una caixa de congelació.

### 1.1.5.3 Protocol de descongelació

1. Es treu el criotub del tanc de nitrogen i es descongela en un bany a  $37^{\circ}\text{C}$  ràpidament, de manera que el DMSO no pugui afectar la viabilitat de les cèl·lules.
2. S'afegeix el volum de cèl·lules descongelat en un tub de plàstic de 15 ml que tindrem ja preparat amb 10 ml de medi de cultiu.
3. Es centrifuga a  $1000 \times g$  durant 2 minuts i es resuspen el pellet de cèl·lules en 10 ml de medi de cultiu CS 10%.
4. Es sembren les cèl·lules en una placa de 10 cm de diàmetre i s'incuben a l'incubador entre 24 i 48 hores fins que aquestes arribin a un 80 % de la confluència.

### 1.1.6. INCUBACIONS DE CÈL·LULES 3T3-L1 AMB OE EN DIFERENTS VEHICLES

Les incubacions es van fer sempre amb cèl·lules 3T3-L1 una setmana post-diferenciació. En aquest moment les cèl·lules s'incubaven amb la solució corresponent d'OE utilitzant els corresponents controls positius i negatius. Les condicions d'incubació van ser iguals tant per als estudis de lipòlisi com per als estudis d'activitat esterasa:

Preparació dels medi necessaris (en condicions estèrils i sota una campana de flux laminar) per realitzar les incubacions, tant els medis de rentat com les solucions de medi per incubar, que contenien la corresponent quantitat de FBS, OE en el seu vehicle, inhibidors o agonistes de receptors  $\beta$  adrenèrgics o inhibidors de esterases (PMSF). Un cop preparats es mantenien a  $37^{\circ}\text{C}$  fins el moment de començar la incubació.

Mantenint les condicions d'esterilitat i sota una campana de flux laminar es retira el medi de cultiu per aspiració amb una pipeta pasteur i es renten dues vegades amb una solució de PBS atemperada.

S'afegeix amb cura el medi corresponent i es mantenen a l'incubador durant els diferents temps segons l'experiment.

Un cop finalitzada la incubació les mostres es processaven en funció de l'experiment realitzat (valoració de glicerol del medi, valoració d'AMPc intracel·lular, valoració d'activitat esterasa).

### 1.1.6.1. Síntesi d'OE radioactiu (OE-<sup>3</sup>H)

#### REACTIUS:

- Clorur d'oleil (Fluka, Ref: 75135)
- Piridina (Merck, Ref: 9728)
- Diclorometà
- Hexà
- Èter dietílic
- Àcid acètic
- Metanol
- Estrona-<sup>3</sup>H (NEN, New England Nuclear)(E<sub>1</sub>-<sup>3</sup>H)

#### MATERIALS:

- Micro vials cònics de 0,2 ml (Wheaton, Ref: 986281)
- TLC Silica gel amb indicador d'UV (254nm) (Aldrich, Ref: Z26,550-0)
- Cubeta per cromatografia
- Vòrtex i agitador horitzontal de vials
- Centrífuga
- Llum ultraviolada (254 nm) i màscara protectora
- HPLC amb detector de radioactivitat

#### PROCEDIMENT:

##### Síntesi

Totes les operacions de la síntesi van ser realitzades sota campana de gasos.

1. Pipetejar 40 µl d'E<sub>1</sub>-<sup>3</sup>H en un micro vial i evaporar en un bany sec (60°C) amb corrent de nitrogen.
2. Repetir el pas anterior dues vegades (en total es posen a evaporar 120 µl d'E<sub>1</sub>-<sup>3</sup>H).
3. Afegir 3 µl de piridina i 50 µl de diclorometà. Agitar amb el vòrtex intensament.
4. Afegir 3 µl de clorur d'oleil i agitar enèrgicament amb el vòrtex.
5. Afegir 10 µl de diclorometà i tornar a agitar.
6. Deixar el vial tapat i protegit de la llum tota la nit a temperatura ambient.

Cromatografia en capa fina (TLC)

Per tal de separar el producte obtingut a la síntesi dels reactius utilitzats, es fa una cromatografia en capa fina. La fase mòbil de la cromatografia serà hexà : èter dietílic : àcid acètic (20:5:1). Es marcaran carrils en la TLC de sílica de 2.5 cm d'amplada, 10 cm de llargada, i carregant la mostra a 1.5 cm de l'extrem de la TLC (tal i com mostra la figura 1)

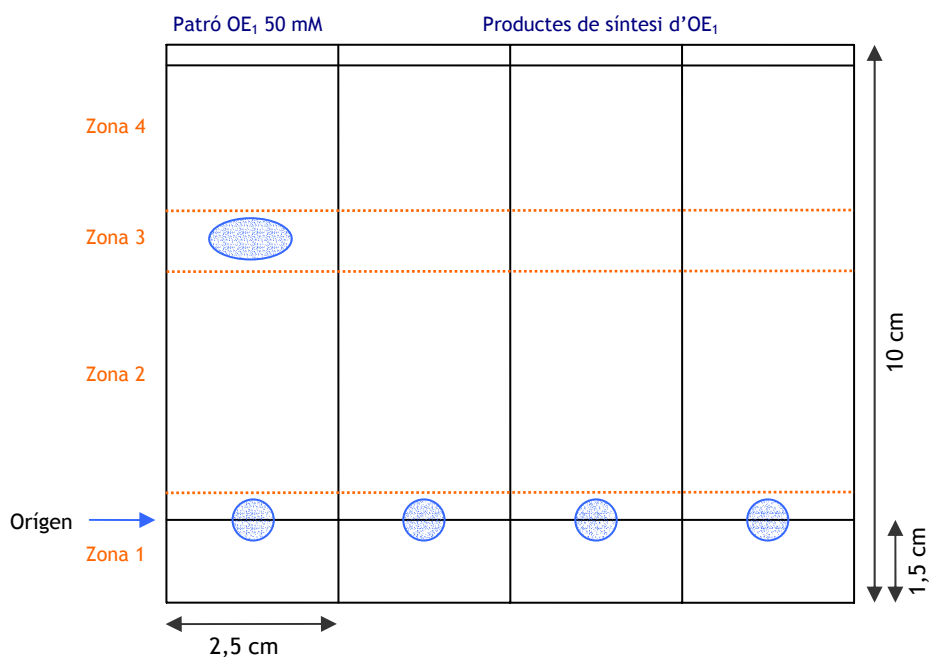


Figura 1: Esquema de la TLC i patró de cromatografia que s'obté.

1. Es carrega tota la solució de síntesi en un carril de sílica i al costat es fa córrer una patró d'OE no radioactiva (50 mM)
2. Es deixa córrer la cromatografia dins una cubeta de vidre amb 78 ml de fase mòbil, fins que la fase mòbil arriba a 0.5 cm de la fi del carril.
3. El resultat de la cromatografia es visualitza amb una llum ultraviolada, a 254 nm de longitud d'ona, de manera que en color blavós es localitzarà l'alçada de la cromatografia on hi ha la patró d'OE (zona 3), que ens indicarà la zona on es troba l'OE-<sup>3</sup>H producte de la síntesi. L'E<sub>1</sub> no esterificada es troba localitzada entre la zona 1 i 2, donat que gairebé no es mou de l'origen de càrrega.
4. Es talla aquesta zona i es deixa agitar en un vial de vidre gran amb 1 ml de metanol tota la nit.
5. Es passa el contingut dels vials a tubs de Folch de 10ml.
6. Es centrifuga a 1000 rpm durant 10 minuts.



7. Es passa el sobrenedant a tubs eppendorfs.

### Cromatografia HPLC

Per verificar que el producte obtingut és OE-<sup>3</sup>H i per determinar la seva puresa, s'analitza una dilució de la solució obtinguda per HPLC.

Es compta la radioactivitat de 20 µl de la dilució emprada en un comptador de centelleig líquid (Tricarb 1500, Packard) i es calcula la radioactivitat total obtinguda de la síntesi d'OE-<sup>3</sup>H.

#### **1.1.6.2. Diferents vehicles per l'incubació de l'OE**

##### ***1.1.6.2.1. OE en etanol***

Pels experiments realitzats amb OE dissolt en etanol es va preparar anteriorment una solució de concentració 100 vegades més concentrada de la desitjada a la incubació per tal de mantenir sempre un màxim d'un 1% d'etanol en el medi de cultiu.

La solució es prepara pesant la corresponent quantitat d'OE en una balança de precisió i solubilitzant-lo en el volum adequat d'etanol absolut.

En cas de tractar-se d'una solució radioactiva d'OE es van utilitzar solucions d'OE 100 µM (fred) carregades amb 5x10<sup>3</sup> dpm/µl d'OE-<sup>3</sup>H que posteriorment es va utilitzar al medi fent una dilució 1/100.

Un cop preparades les solucions d'OE es poden emmagatzemar durant alguns mesos a -20°C.

##### ***1.1.6.2.2. OE en intralípid***

Per tal d'introduir OE en liposomes es va dur a terme el següent protocol:

#### **REACTIUS:**

- Intralipid® (amb un 20 % de lípids)
- Diclorometà
- Metanol
- OE-<sup>3</sup>H i/o OE fred dissolt en etanol
- Aigua destilada

#### **MATERIALS:**

- Rotavaporador
- Embut de decantació
- Xeringa de 20 ml amb agulla
- Sonicador
- Bany sec amb corrent de nitrogen

### *PROCEDIMENT (1ml solució):*

1. Aspirar 20 ml de la solució d'Intralipid amb una xeringa de 20ml a través del tap de goma de l'ampolla.
2. Afegir els 20 ml en un embut de decantació al que s'afegirà 93 ml de diclorometà i 46 ml de metanol.
3. Agitar enèrgicament amb el tap posat i deixar reposar fins que es separin 2 fases: aquosa (superior) i lipídica (inferior).
4. Obtenir per separat les dues fases i rotavaporar-les per separat.
  - 4.1. Fase lipídica: rotavaporar fins que tingui una consistència pastosa i acabar d'evaporar al bany sec a 90°C en corrent de nitrogen. El volum final que s'ha d'obtenir són 4 ml.
  - 4.2. Fase aquosa: rotavaporar i portar a un volum final de 16 ml amb aigua destil·lada.
5. Evaporar 20 µl d'OE 50 mM en etanol en un eppendorf de 2 ml sota corrent de nitrogen.
6. Afegir 200 µl de fase lipídica i barrejar amb la pipeta per tal de resuspendre l'OE.
7. Afegir 800 µl de la fase aquosa i tornar a barrejar amb la pipeta.
8. Sonicar intervals curts (30 segons, 30 segons i 1 minut) intercalats amb agitació per vòrtex. Acabar realitzant una última agitació per vòrtex. Condicions de sonicació: Model VC 130 PB (20 KHz) Amplitud 30/Output 0.4W.

En cas de tractar-se d'una solució radioactiva d'OE es va preparar una solució d'OE 1000 µM (fred) carregades amb  $5 \times 10^4$  dpm/µl d'OE-<sup>3</sup>H que posteriorment es va utilitzar al medi fent una dilució 1/1000. En aquest cas l'OE marcat s'afegia a la solució freda per evaporar a l'eppendorf.

### 1.1.6.2.3. OE en HDL

Per aconseguir HDL de rata carregades amb OE radioactiu és necessari transferir la hormona de manera artificial a l'interior d'aquestes partícules. El protocol utilitzat per fer-ho va ser mitjançant pols de diatomees (celite), partícules de pols molt petites que són capaces d'adsorbir esters d'estradiol en la seva superfície i transferir-los a lipoproteïnes (Meng QH, Hockerstedt A, Heinonen S, Wahala K, Adlercreutz H, Tikkanen MJ. *Biochim Biophys Acta*. 1999 Aug 18;1439(3):331-40). Així el que varem fer va ser adaptar el protocol per transferir l'OE les partícules d'HDL obtingudes de sang de rata. La fracció d'HDL de plasma de rata ens va ser cedida per dur a terme l'assaig.

#### REACTIUS:

- Àcid clorhídric 1% en volum
- Metanol pur
- Cloroform
- Celite 545

#### MATERIALS

- Columnes de Sephadex G-25/PD-10 amb Kanthon CG com a conservant (Amersham Pharmacia Biotech)
- Xeringues de 20ml
- Filtres Millipore 0,45 µm

#### PROCEDIMENT:

A partir de les HDL purificades i dessalinitzades es va procedir a incorporar l'OE dins l'estructura lipoprotèica.

#### c) Rentat del celite

1. Pesar 7.8 g de celite 545 en un tub de 50 ml.
2. Rentar 3 cops amb àcid clorhídric diluït (1%)
3. Rentar 4-5 vegades amb aigua bidestil·lada estèril.
4. Esperar a la precipitació total del celite i decantar l'aigua del sobrenedant.
5. Deixar assecar el celite net a 50°C tota la nit.
6. Afegir metanol pur i secar totalment en corrent de nitrogen.

d) Copulació OE-<sup>3</sup>H/OE fred amb celite.

1. Evaporar en un tub de 5 ml de pyrex les següents quantitats:
  - 1 µmol d'OE (1ml d'OE 1mM en etanol)
  - 24x10<sup>6</sup> dpm de <sup>3</sup>H-OE
2. Un cop evaporat resuspendre en 1 ml de cloroform
3. Afegir 50 mg de celite net
4. Agitar i secar sota corrent de nitrogen
5. Afegir HDL (1mg de proteïna). Passar a un tub folch de 40 ml i incubar en agitació a 37°C i amb una atmosfera de nitrogen durant 20-22 hores.
6. Recollir les HDL per centrifugació a 3000 g 30 minuts a TA.
7. Filtrar amb Millipore 0.45 µm
8. Passar per una nova columna de Sephadex G-25 i contar una alíquota en un contador β-1500 per calcular l'activitat específica obtinguda.

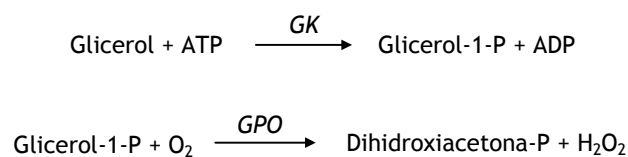
#### 1.1.7. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT LIPOLÍTICA EN ADIPÒCITS 3T3-L1

Les cèl·lules incubades durant el temps corresponent eren processades per tal de determinar-ne l'activitat lipolítica induïda durant el període d'incubació valorant el glicerol alliberat al medi de cultiu o l'AMPc intracel·lular.

##### 1.1.7.1. Determinació de glicerol en medi de cultiu

La valoració del glicerol alliberat per les cèl·lules al medi de cultiu es va realitzar amb el reactiu de valoració de glicerol Reagent A del kit Triglyderide (GPO-Trinder) de Sigma Diagnostics (Sant Louis, USA). Aquest reactiu mesura el glicerol de la mostra amb una cadena de reaccions enzimàtiques catalitzades per la glicerol cinasa (GK), glicerol fosfat oxidasa (GPO) i la peroxidasa (POD). Com a producte es genera un producte, la quinoneimina, que té una absorbància màxima a 450nm i que és proporcional a la concentració de glicerol de la mostra.

Les reaccions que es duen a terme en la valoració són les següents:





Les mostres de medi de cultiu valorades es recollien al finalitzar al incubació i es mantenen a 4°C fins al moment de la valoració (el mateix dia de la incubació)

**PROCEDIMENT:**

1. Preparar la patró de glicerol (No. G1394, Sigma Diagnostics) entre les concentracions 0.025 mM i 2 mM de glicerol.
2. Diluir les mostres de medi ¼ amb aigua bidestil·lada.
3. Pipetejar a cada pou d'una placa de 96 pous 100 µl de solució patró o mostra diluïda.
4. Afegir 100 µl de reactiu de valoració a cada pou.
5. Incubar durant 10 minuts a temperatura ambient.
6. Llegir a l'absorbància a 540nm.

**1.1.7.2. Determinació de l'AMPc intracel·lular**

Les incubacions per valorar l'activitat lipolítica mitjançant els valors d'AMPc intracel·lular es duen a terme igual que les de valoració del glicerol tret que les incubacions amb OE eren de 3 minuts, temps suficient per estudiar aquests valors.

Preparació de les mostres per valorar AMPc

1. Les cèl·lules s'arrencaven amb 0.5 ml de PBS i amb l'ajut d'un scrapper un cop finalitzat l'experiment d'incubació.
2. Una mostra de 0.2 ml de cèl·lules en PBS es barrejava amb 0.2 ml d'àcid perclòric al 6% i la resta es guardava per valorar proteïna (secció 1.1.11).
3. Després de vortejar vigorosament la barreja, aquesta es centrifugava durant 15 minuts a 13000 rpm.
4. Una mostra de 350 µl del sobrenedant es neutralitzen amb NaOH 2N (controlant el pes del volum afegit pesant el tub abans i després de neutralitzar)
5. Guardar a -20°C fins al moment de la valoració d'AMPc.

### Valoració d'AMPc

La valoració d'AMPc intracel·lular es va dur a terme mitjançant el kit Cyclic AMP (3H) assay system (TRK 432 d'Amersham), seguint les indicacions del fabricant. Aquest kit es basa en la competició entre l'AMPc fred i una quantitat fixa d'aquest compost marcat per la unió a una proteïna amb gran especificitat i afinitat per l'AMPc. Així la quantitat de complex marcat proteïna-AMPc és inversament proporcional a la quantitat de AMPc no marcat a l'assaig. El volum de mostra neutralitzada de lisat cel·lular requerida per la valoració era de 50 µl.

### **1.1.8. VALORACIÓ D'ACTIVITAT ESTERASA EN CÈL·LULES 3T3-L1**

Per valorar l'activitat esterasa dels adipòcits 3T3-L1 es van incubar en presència d'OE-<sup>3</sup>H i se'n va determinar la hidròlisi fent un seguiment de la radioactivitat fora i dins de la cèl·lula. Basant-nos en el diferent factor de retenció ( $R_f$ ) de l'OE i l'E en una cromatografia de capa prima (TLC) varem poder quantificar la radioactivitat que es trobava en cadascuna de les formes.

#### **1.1.8.1 Processat del medi i les cèl·lules**

1. Retirar el medi d'incubació (2 ml) i contar-ne una alíquota de 20 µl en un contador de centelleig líquid. Reservar la resta del volum per fer-ne una extracció de lípids i posterior TLC. (secció 1.1.8.2 i 1.1.8.3)

Les cèl·lules enganxades a la placa de cultiu es renten dues vegades amb PBS i s'arrenquen amb 1ml de PBS. Contar una alíquota de 50 µl en un contador β de centelleig. La resta del volum es reserva per fer-ne una extracció de lípids i TLC. (secció 1.1.8.2 i 1.1.8.3)

#### **1.1.8.2 Obtenció d'un extracte lipídic (Folch)**

Per tal d'extreure les substàncies lipídiques de la mostra s'ha utilitzat sempre el mètode descrit per Folch et al. (1957). Aquesta tècnica permet obtenir un extracte lipídic que conté totes les substàncies lipòfiles de la mostra.

#### **MATERIAL:**

- Tubs de Folch de 10 ml
- Agitador Orbital
- Centrífuga

**REACTIUS:**

- Cloroform : metanol (2:1)
- NaCl 0.9%

**PROCEDIMENT:**

1. Afegir 10 ml de cloroform : metanol (2:1) a 1 ml de mostra líquida (medi de cultiu, lisat cel·lular, etc...).
2. Agitar en un agitador orbital durant 24 hores.
3. Afegir 2 ml de solució salina (NaCl 0.9%).
4. Agitar en un agitador orbital durant 30 minuts.
5. Centrifugar a 1500 rpm durant 10 minuts.
6. Amb l'ajuda d'una pipeta pasteur de vidre, aspirar la fase inferior de cloroform que serà l'extracte lipídic de la mostra en el que es troba l'OE i l'E<sub>1</sub>.

**1.1.8.3 TLC per quantificar OE i E**

Per quantificar l'OE i E<sub>1</sub> dels extractes lipídics s'ha utilitzat el següent protocol de TLC:

1. Evaporar a sequedat en corrent de nitrogen gas l'extracte lipídic obtingut pel mètode de Folch.
2. Amb l'ajut d'un vòrtex resuspendre el pellet sec en 50 µl d'etanol pur.
3. Realitzar una TLC tal i com s'explica en l'apartat de la síntesi d'OE radioactiva (secció 1.1.6.1) tret que en aquest cas es carregaran 20 µl de cada mostra al punt d'origen del carril, i en un dels carrils de cada placa de sílica aplicar 20 µl de patró d'OE 50 mM que ens servirà per saber el seu R<sub>f</sub>.
4. Un cop visualitzat el resultat de la cromatografia es retallen les zones tal i com es mostra a l'esquema de la figura 1, i es conten per centelleig les dpm que conté cadascuna de les zones.
5. El contatge corresponent a la zona 3 serà el que correspon a l'OE, mentre que el de la zona 1 i la zona 2 serà el que correspondrà a l'E<sub>1</sub> de la mostra.

**1.1.9. FRACCIONAMENT SUBCEL·LULAR D'ADIPÒCITS 3T3-L1**

El fraccionament subcel·lular dels adipòcits 3T3-L1 es va dur a terme segons el protocol descrit anteriorment per Simpson (Simpson IA, Yver DR, Hissin PJ, Wardzala LJ,

Karnieli E, Salans LB, Cushman SW. *Biochim Biophys Acta*. 1983 Dec 19;763(4):393-407). El protocol es duu a terme a partir d'adipòcits diferenciats crescuts en plaques de cultiu de 10 cm de diàmetre. De cada homogenat de cèl·lules obtindrem fraccions enriquides de:

- Membranes de baixa densitat (LDM)
- Membranes d'alta densitat (HDM)
- Membrana plasmàtica (MP)
- Mitocondris i nuclis (MN)
- Citosol (C)

### SOLUCIONS:

- HES (pH 7.4)
  - Hepes 20 mM (pH 7.4)
  - EDTA 1 mM
  - Sacarosa 255 mM
- HES (pH 7,4) + Inhibidors de proteases:
  - Hepes 20 mM
  - EDTA 1 mM
  - Sacarosa 255 mM
  - Pepstatina 1 µM
  - Leupeptina 1 µM
  - Benzamidina 5 mM
  - Fluorur de fenil-metil-sulfonil (PMSF) 1 mM
  - Aprotinina 1 mM
- Coixí de sacarosa:
  - Hepes 20 mM
  - Sacarosa 1, 12M
- Hepes 30 mM

### PROCEDIMENT:

1. Posar les plaques en gel i fer dos rentats amb 4 ml de HES
2. Amb l'ajut d'un "scraper", s'arrenquen les cèl·lules de dues plaques amb 4 ml de HES + inhibidors de proteases per placa i es posen en un homogeneïtzador manual refredat en gel. Fer un segon rentat de les plaques amb 2 ml més per recollir el



màxim de cèl·lules i afegir-ho al homogeneïtzador. Així doncs tindrem un volum total d'homogenat de 12 ml en cada homogeneïtzador.

3. Homogeneïtzar amb un èmbol de tefló 10 vegades.
4. Recollir l'HOMOGENAT en tubs Nalgene de 30 ml i centrifugar a 15800 x g (10.400 rpm en un rotor Sorvall SA-600) durant 20 minuts a 4°C. Reservat una alíquota d'homogenat en gel.
5. Descartar el greix sòlid de la part superior del tub.
  - 5.1. Recollir el *sobrenedant* (del que s'obtiniran les fraccions LDM i HDM) i transferir a un tub d'ultracentrífuga de 10 ml i el centrifuguem a 44.000 x g (21.000 rpm en rotor Sorvall T-875) durant 20 minuts a 4°C.
    - 5.1.a. Transferir el *sobrenedant* d'aquesta segona centrifugació el transferim a un tub d'ultracentrífuga de 10 ml i centrifugar a 180.000 x g (45.000 rpm rotor T875) durant 75 minuts a 4°C.

Recollir el *sobrenedant* que correspon al CITOSOL (C)

Resuspendre el *pellet* que s'obté en 300 µl d'HEPES 30 mM, aquesta fracció correspon a MEMBRANES DE BAIXA DENSITAT (LDM).
    - 5.1.b. Resuspendre el *pellet* d'aquesta segona centrifugació en 5 ml de HES a 4°C i centrifugar a 35.000 x g (15.500 rpm en rotor T-875, Sorvall) durant 20 minuts a 4°C.

Resuspendre el *pellet* que s'obté en 200 µl d'HEPES 30 mM, aquesta fracció correspon a MEMBRANES D'ALTA DENSITAT (HDM).
  - 5.2. Resuspendre el *pellet* (del que s'obtiniran les fraccions MP i MN) en 1 ml d'HES i dipositar sobre 9 ml de coixí de sacarosa 1.12 M en un tub d'ultracentrífuga de 10 ml i el centrifugar a 100.000 x g (24.500 rpm en rotor basculant TH-641) durant 20 minuts a 4°C.
    - 5.2.a. Recollir amb una pipeta Pasteur l'*interfase* que queda sobre el coixí de sacarosa i transferir-la a un tub (Nalgene) i centrifugar a 16.000 x g (11.500rpm en rotor Sorvall SA-600) durant 20 minuts a 4°C.

Resuspendre el *pellet* que s'obté en 100 µl d'HEPES 30 mM, aquesta fracció correspon a MEMBRANA PLASMÀTICA (MP).
    - 5.2.b. Resuspendre el *pellet* resultant del coixí de sacarosa en 10 ml de HES a 4°C i centrifugar a 16.000 x g (11.500rpm en rotor Sorvall SA-600) durant 20 minuts a 4°C.

Resuspendre el *pellet* que s'obté en 100 µl d'HEPES 30 mM, aquesta fracció correspon a MITOCÒNDRIS I NUCLIS (MN)

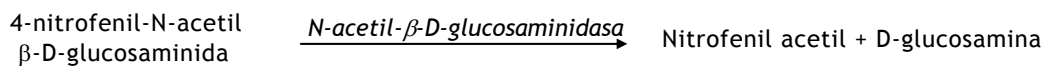
6. Repartir en alíquotes cada fracció i congelar a -80°C
7. Valorar la proteïna recuperada (veure secció 1.1.11)

#### 1.1.9.1. Determinacions enzimàtiques per estimar la puresa de les fraccions

Per determinar la puresa de les fraccions obtingudes en el fraccionament subcel·lular, es van dur a terme valoracions d'activitats enzimàtiques específiques de diferents localitzacions subcel·lulars. Així doncs, es va valorar l'activitat N-acetil-β-D-glucosaminidasa per ser un enzim de localització lisosomal, l'activitat 5'-nucleotidasa per localitzar a la membrana plasmàtica, l'activitat glucosa-6-fosfatasa com a marcador de reticle endoplasmàtic i la succinat deshidrogenasa per fer palesa la presència de membrana mitocondrial.

##### 1.1.9.1.1. Determinació de l'activitat N-acetil-β-D-glucosaminidasa (enzim lisosomal)

Adaptació dels mètodes de Boroach i col (1961) i de Carroll (1978), basats en la mesura espectrofotomètrica del nitrofenil-acetil alliberat en la següent reacció:



#### REACTIUS:

- Tampó d'incubació: Tampó citrat sòdic 0.05M (pH4.4) Afegir el mateix dia de l'assaig 0.2% de tritó X-100.
- Substrat: 4-nitrofenil-N-acetil-β-D-glucosamina 5mM en tampó d'incubació.
- Tampó d'aturada i coloració: Tampó glicina/NaOH 0.5M (pH10.4)
- Solució de 4-nitrofenol: 50mM en tampó d'incubació.

#### PROCEDIMENT:

Els volums es van adaptar per realitzar la valoració en microplaques de 96 pous.

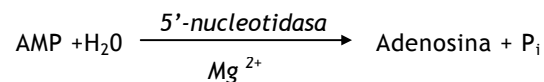
1. Carregar per duplicat els punts de patró a partir d'una dilució 1/10 de la solució mare de 4-nitrofenol 50mM i els següents volums de tampó d'incubació en cadascun dels pous.

nmols/pou	4-nitrofenol	T.incubació
0	-	10 µl
5	1 µl	9 µl
10	2 µl	8 µl
20	4 µl	6 µl
30	6 µl	4 µl
40	8 µl	2 µl

2. Carregar 10 µl de cada mostra a la placa i preincubar-la durant 5 minuts a 37°C.
3. Afegir 40 µl de substrat a les mostres i 40 µl de tampó d'incubació a la patró i agitar la placa.
4. Incubar durant 30 minuts a 37°C.
5. En el mateix ordre en el que hem afegit el substrat, afegir a tots els pous 250 µl de tampó d'aturada o coloració.
6. Llegir l'absorbància en un lector espectrofotòmetre a  $\lambda=420\text{nm}$

#### 1.1.9.1.2. Determinació de l'activitat 5'-nucleotidasa (enzim de membrana plasmàtica)

Aquesta activitat s'ha valorat per un mètode que es basa en una modificació del d'Aranson i Touster (1974) en el qual es quantifica el fosfat inorgànic generat com a conseqüència de la següent reacció:



#### REACTIUS:

- Barreja de reacció: Es preparen els components per separat i es barregen abans de fer la valoració:

- A.  $\text{MgCl}_2$  0.1 M
- B. Tampó glicina/NaOH 0.5 M (pH9.1)
- C. AMP sal sòdica 50mM (pH 7) (s'ha de preparar al moment)

Les proporcions de barreja: 1 volums A + 2 volums B+ 1 volum C + 1 volum  $\text{H}_2\text{O}$

- Reactiu de valoració: Consta de 4 components que també es barrejaran el dia de l'assaig:

- A. SDS 20% en H<sub>2</sub>O.
- B. Molibdat amònic 10% en hidròxid amònic 0.9%.
- C. Monovanadat d'amoni al 0.235% i àcid nítric 1.42%.
- D. Àcid nítric pur.

Les proporcions de barreja: *10 volums A + 20 volums B+ 10 volum C + 3.7 volum D + 66.3 volums d'H<sub>2</sub>O*

- Solució de fosfat monopotàssic 10mM

### PROCEDIMENT:

Els volums es van adaptar per realitzar la valoració en microplaques de 96 pous. Cal recordar de realitzar blancs de mostra en els que valorarem el Pi que conté la mostra i que no és produït per l'enzim.

1. Carregar per duplicat els punts de patró a partir d'una dilució 1/10 de la solució mare de fosfat monopotàssic 10mM i els següents volums de barreja de reacció en cadascun dels pous.

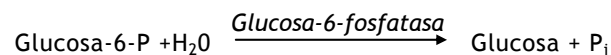
nmols/pou	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1mM	BR
0	-	37.5 µl
3.7	3.7 µl	33.75 µl
7.5	7.5 µl	30 µl
15	15 µl	22.5 µl
22.5	22.5 µl	15 µl

2. Carregar 7.5 µl de mostra i 7.5 µl pel blanc i preincubar la placa durant 5 minuts a 37°C.
3. Afegir als blancs 37.5 µl de reactiu de valoració i agitar la placa.
4. Afegir a les mostres i blancs 30 µl de barreja de reacció i agitar suaument la placa.
5. Incubar 15 minuts a 37°C.
6. Afegir a les mostres i la patró, respectant l'ordre anterior, 37.5 µl de reactiu de valoració.
7. Agitar suaument la placa i afegir 225 µl d'aigua destil·lada a tots els pous.
8. Deixar reposar durant 20 minuts a temperatura ambient.

9. Llegir l'absorbància en un lector espectrofotòmetre a  $\lambda=350\text{nm}$

**1.1.9.1.3. Determinació de l'activitat glucosa-6-fosfatasa (enzim de reticle endoplasmàtic)**

Aquest protocol està basat en el mètode de Baginski i col.(1974), en el qual es quantifica el fosfat inorgànic que es produeix en la reacció següent:



**REACTIUS:**

- Tampó citrat 0.1M (pH6.5).
- Glucosa-6-P 80mM en tampó citrat.
- Solució de fosfat monopotàssic 10mM.
- Reactiu de valoració: Consta de 4 components que també es barrejaran el dia de l'assaig:
  - A. SDS 20% en H<sub>2</sub>O.
  - B. Molibdat amònic 10% en hidròxid amònic 0.9%.
  - C. Monovanadat d'amoni al 0.235% i àcid nítric 1.42%.
  - D. Àcid nítric pur.

Les proporcions de barreja: *10 volums A + 20 volums B+ 10 volum C + 3.7 volum D + 66.3 volums d'H<sub>2</sub>O*

**PROCEDIMENT:**

Els volums es van adaptar per realitzar la valoració en microplaques de 96 pous. Cal recordar de realitzar blancs de mostra en els que valorarem el Pi que conté la mostra i que no és produït per l'enzim.

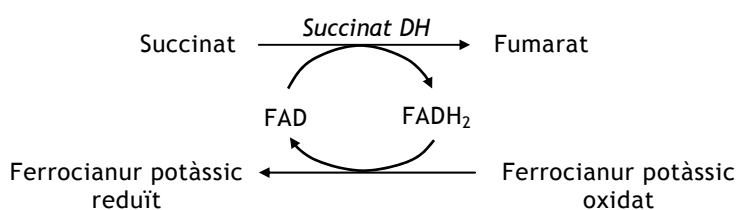
1. Carregar per duplicat els punts de patró a partir d'una dilució 1/10 de la solució mare de fosfat monopotàssic 10mM i els següents volums de tampó citrat en cadascun dels pous.

nmols/pou	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1mM	Tampó citrat
0	-	16 µl
2	2 µl	14 µl
4	4 µl	12 µl
6	6 µl	10 µl
10	10 µl	6 µl

- Carregar 8 µl de mostra i 8 µl pel blanc i pre-incubar la placa durant 5 minuts a 37°C.
- Afegir als blancs 8 µl de tampó citrat i agitar la placa.
- Afegir a les mostres 8 µl de glucosa-6-P i agitar suaument la placa.
- Incubar 15 minuts a 37°C.
- Afegir a les mostres i la patró, respectant l'ordre anterior, 40 µl de reactiu de valoració.
- Agitar suaument la placa i afegir 240 µl d'aigua destil·lada a tots els pous.
- Deixar reposar durant 20 minuts a temperatura ambient.
- Llegir l'absorbància en un lector espectrofotòmetre a  $\lambda=350\text{nm}$ .

#### 1.1.9.1.4. Determinació de l'activitat succinat deshidrogenasa (enzim membrana mitocondrial)

La valoració de l'activitat d'aquest enzim està basada en el protocol descrit per Bonner (1955) en el qual es redueix el ferrocianur potàssic (KCN) en una reacció acoblada al pas de succinat a fumarat dut a terme per la succinat deshidrogenasa.



#### REACTIUS:

- KCN 0.1 M.
- FeK<sub>3</sub>(CN)<sub>6</sub> 0.01 M.
- Succinat sòdic 0.2 M.
- Tampó fosfat 0.135 M (pH 7.2): Preparar a partir de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> i K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> fins ajustar el pH a 7.2.

**PROCEDIMENT:**

Els volums es van adaptar per realitzar la valoració en microplaques de 96 pous.

1. Afegir a cada pou:
  - 30 µl KCN 0.1M
  - 30 µl FeK<sub>3</sub>(CN)<sub>6</sub> 0.01 M
  - 20 µl succinat sòdic 0.2 M.
  - 220 µl tampó fosfat pH 7.2.
2. La valoració s'ha de realitzar mostra per mostra i al costat del lector d'espectrofotòmetre. Per cadascuna de les mostres i per duplicat, pipetejarem 5 µl dins el pou i contarem aquest temps com t=0 segons.
3. Agitarem la placa suaument i col·locarem la placa dins el lector.
4. Llegim l'absorbància a λ=400nm començant la primera lectura a t=15 segons i cada 10 segons durant 1 minut.
5. Calculem l'activitat enzimàtica mitjançant la fórmula:

$$nkat = \frac{\Delta Abs_{400nm}}{\Delta temps \text{ (segons)}}$$

**1.1.10. VALORACIÓ D'ACTIVITAT ESTERASA EN FRACCIONS SUBCEL·LULARS DE 3T3-L1**

Les fraccions subcel·lulars obtingudes s'incuben en presència d'OE marcat radioactivament i després es realitza una extracció lipídica de la mostra i una quantificació dels diferents compartiments de radioactivitat per determinar la quantitat de E i OE present.

Les incubacions es realitzaven a diferents pHs (5, 7 o 8) per estimar el pH òptim de l'activitat enzimàtica.

**REACTIUS I MATERIALS:**

- Tampó pH 5: Tampó citrat 50mM + sacarosa 250mM. Ajustar pH=5
- Tampó pH 7: Tampó Tris HCl 50mM + sacarosa 250mM. Ajustar pH=7
- Tampó pH 8: Tampó Tris HCl 50mM + sacarosa 250mM. Ajustar pH=8
- Solució d'OE en etanol
- Solució OE-<sup>3</sup>H
- Bany d'incubació a 37°C
- Cloroform

### PROCEDIMENT:

1. Preparar les solucions de fraccions subcel·lulars, OE-<sup>3</sup>H i OE fred necessàries per realitzar una incubació amb els següents volums i concentracions:
  - 75 µl de fracció subcel·lular = 25 µg de proteïna
  - 25 µl d'OE-<sup>3</sup>H = 200.000 dpm
  - 25 µl OE fred = 1µM (final a la incubació)Preparar les dilucions necessàries en el tampó d'incubació corresponent en cada cas.
2. Incubar la barreja de cadascuna de les fraccions per amb els 3 tampons de pH5,7 i 8 per triplicat. Realitzar la incubació en tubs eppendorf a 37°C durant 2 hores.
3. Aturar la reacció afegint 1 ml de cloroform al tub.
4. Centrifugar a 1500 rpm per separar la fase orgànica de la aquosa.
5. Evaporar la fase orgànica resultant en corrent de nitrogen.
6. Resuspendre en 100 µl d'etanol i contar-ne 50 µl al comptador β-1500 per estimar la radioactivitat total.
7. Amb el 50 µl restants es procedeix a fer una cromatografia de capa prima (veure secció 1.1.6.1) per quantificar el marcatge corresponent a E i OE.

### 1.1.11. VALORACIÓ DE PROTEÏNA

La valoració de proteïnes present en molts dels experiments d'aquesta tesi s'ha dut a terme pel mètode de Coomassie. S'ha utilitzat un kit comercial adaptat per la valoració en microplaca de 96 pous (Coomassie Protein Assay Reagent Kit, Pierce Biothecnoogy)

La valoració es fa mitjançant una recta patró d'albumina amb les concentracions 1mg/ml, 0.75mg/ml, 0.5mg/ml, 0.25mg/ml i 0.125mg/ml.

Tant de la patró com de les mostres se'n carrega 10 µl i 200 µl de reactiu de Coomassie. S'agita la placa s'incuba durant 10 minuts a temperatura ambient. La lectura es realitza a 595 nm amb un lector de plaques.

### 1.2. ESTUDIS DE *BINDING* DE RECEPTORS β-ADRENÈRGICS

En aquest treball s'han realitzat dos tipus d'experiments de *binding*: de competició i de *scatchard*. En el primer dels casos s'utilitza un agonista o antagonista dels receptors d'interès i es fa competir amb ell mateix fred com a control positiu i amb el lligand d'interès fred per veure si és capaç de desplaçar de la unió el seu agonista. D'aquesta manera podem



saber si la molècula d'estudi, en el nostre cas l'OE, s'uneix específicament al receptor estudiat (receptors  $\beta$ -adrenèrgics). En el segon dels dissenys experimentals el que s'estudia és la cinètica d'unió d'un agonista/antagonista del receptor en presència o absència d'una molècula d'interès (l'OE). Així podem estudiar si l'OE modifica les constants cinètiques de la unió del receptor amb el seu lligand.

Els estudis de competició es van realitzar amb membrana aïllada de cèl·lules adiposes de TAB epididimal, mentre que els estudis de *scatchard* es van realitzar amb membranes de cèl·lules humanes procedents de liposuccions i enriquides en receptor  $\beta_1$  o  $\beta_2$ . En el primer dels casos es va obtenir la membrana al laboratori a partir de rates Wistar, mentre que en el segon cas la membrana era comercial.

### 1.2.1. OBTENCIÓ DE MEMBRANA D'ADIPÒCITS

El procés general consta d'una primera fase d'aïllament dels adipòcits de rata, una segona fase de xoc hipotònic per tal de destruir l'estructura cel·lular i una última fase d'obtenció de la membrana per ultracentrifugació.

#### REACTIUS:

- Tampó Krebs-Henseleit: NaCl 150mM, KCl 6,17mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,54mM,  $\text{NaHCO}_3$  25mM,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1,58mM. Gasejar amb gas carbogen durant 30 minuts a 37°C i ajustar-ne el pH a 7,4.
- Tampó d'incubació: Tampó Krebs-Henseleit al que just abans d'utilitzar-lo s'afegeix glucosa 5mM, albúmina sèrica bovina (BSA) al 3% i  $\text{CaCl}_2$  0.5mM.
- Tampó col·lagenasa: Tampó d'incubació al que s'afegeix 0.5mg/ml de col·lagenasa H.
- Tampó hipotònic (pH 7,4): Tris HCl 2mM,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  2,5mM,  $\text{KHCO}_3$  1mM, EGTA 100 $\mu$ M, Leupeptina 10 $\mu$ g/ml, PMSF 300 $\mu$ M.
- Tampó de resuspensió: Tris HCl 50mM,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.5mM. Ajustar el pH a 7,4
- Mitja de lycra
- Vials erlenmeyer de 5ml de plàstic.
- Xeringues de 20ml i agulles.
- Gas carbògen.

#### PROCEDIMENT:

1. Sacrificar una rata per decapitació i obtenir el més ràpid possible el teixit adipós perigenital.

2. Aliquotar el teixit en fragments d'1g ben trossejat.
3. Introduir cada gram en vials erlenmeyer de 5ml als que prèviament hem afegit 3ml de tampó col·lagenasa.
4. Incubar durant 45 minuts a 37°C amb una agitació del 35%. Gasejar amb carbogen cada 15 minuts.
5. Filtrar el contingut dels vials a través de 3 capes de mitja de lycra. Empènyer amb l'èmbol de la xeringa per ajudar al pas dels adipòcits a través de la mitja.
6. Recollir-los en una xeringa de 25ml cap per avall i amb l'orifici de sortida tapat amb un tap de gona. Afegir 20 ml de tampó d'incubació.
7. Deixar surar els adipòcits durant 2 o 3 minuts i buidar l'infranadant.
8. Tornar a afegir els 20 ml de tampó d'incubació i repetir el procés 3 vegades més.
9. Buidar l'últim infranadant i recollir els adipòcits nets en un tub de centrifuga de 50 ml.
10. Afegir 20 ml de tampó hipotònic i vortejar durant 3 minuts a temperatura ambient per afavorir la lisi i evitar que la membrana quedi atrapada en el greix.
11. Repartir en 2 tubs d'ultracentrifuga de 10 ml (rotor T-875) i centrifugar a 40000 xg durant 15 minuts a 4°C.
12. Descartar el sobrenadant i resuspendre el pellet en 1 ml de tampó hipotònic. Canviar de tub i rentar la membrana restant amb 1 ml més de tampó i acabar d'omplir el nou tub amb 8ml més de tampó hipotònic.
13. Descartar el sobrenadant i resuspendre el pellet en 1ml de tampó de resuspensió per tub. La resuspensió es fa amb una xeringa i agulla per tal de marcar la mida dels fragments de membrana. Guardar en alíquotes de 100 µl a -80°C.
14. No oblidar de guardar una alíquota de 30 µl per valorar-ne el contingut de proteïna pel mètode de Bradford.

### 1.2.2. ESTUDI DE *BINDING* DE COMPETICIÓ

#### *REACTIUS I MATERIALS:*

- Tampó Tris HCl: Tris HCl 50mM, MgCl<sub>2</sub> 0.5mM. Ajustar pH a 7,5.
- Filtres Millipore de fibra de vidre.
- Membrana aïllada d'adipòcit de rata.
- CGP-12177-<sup>3</sup>H.
- OE fred

- Bomba de buit.
- Pinces planes per manipular els filtres
- Propanolol 10  $\mu$ M
- Polietileneimida (PET) 0.3% (Sigma)

**PROCEDIMENT:**

1. Preparar les membranes necessàries per l'assaig en tampó PET 0.3%.
2. Preparar dilucions en tampó de les hormones no radioactives (CGP-12177 i OE) a concentracions 8 vegades les següents, per obtenir aquestes concentracions finals a la incubació:

10  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 100 nM, 10 nM, 1 nM, 0,1 nM

3. A més d'aquestes diferents concentracions de cada una de les 2 hormones també realitzarem un punt d'unió màxima de CGP-<sup>3</sup>H i un punt d'unió inespecífica amb propanolol. Cada incubació contindrà:

U màxima: 25  $\mu$ l de CGP-<sup>3</sup>H 10nM+ 25  $\mu$ l de membrana

U inespecífica: 25  $\mu$ l de CGP-<sup>3</sup>H 10nM + 25  $\mu$ l propanolol 10  $\mu$ M + 25  $\mu$ l de membrana

Diferents concentracions hormona (CGP/OE): 25  $\mu$ l de CGP-<sup>3</sup>H 10nM + 25  $\mu$ l hormona (CGP/OE) + 25  $\mu$ l de membrana.

4. La incubació es prepara en tubs eppendorf posant cadascun dels components corresponents a cada punt i tampó fins a un volum final de 0.2 ml deixant la membrana pel final. La membrana s'afegeix de tub a tub cada 40 segons.
5. Deixar incubar durant 45 minuts.
6. Respectant el mateix ordre utilitzat per iniciar la incubació:
  - 6.1. Col·locar un filtre Millipore sobre la bomba de succió
  - 6.2. Buidar el contingut de l'eppendorf sobre el filtre i rentar amb 10 ml de tampó Tris-HCl.
  - 6.3. Aturar la bomba de buit i retirar el filtre. Introduir-lo amb unes pinces dins un vial de centelleig que conté 4 ml de líquid de centilació.

Aquest procés entre mostra i mostra ha de durar uns 40 segons, per no perdre el desfasament que hem fet en la incubació.

7. Contar els vials en un contador de centelleig  $\beta$ -1500 un cop vortejats.

### 1.2.3. Experiment d'*scatchard*

Els reactius i material utilitzats són els mateixos que en cas del binding de competició tret que en aquest cas també s'utilitza CGP-12177 sense marcatge radioactiu.

#### PROCEDIMENT:

1. Preparar les membranes necessàries per l'assaig en tampó PET 0.3%
2. Preparar dilucions en tampó de l'hormona radioactiva (CGP-12177- $^3\text{H}$ ) per obtenir una concentració final 540  $\mu\text{l}$  al afegir 20  $\mu\text{l}$  d'aquestes dilucions:

20nM, 10nM, 5nM, 2.5nM, 1nM, 0.4nM, 0.2nM, 0.1nM, 0.05nM.

Així les solucions a preparar seran: 540nM, 235nM...

3. Preparar també una solució d'OE 1  $\mu\text{M}$  i una solució de propranolol 1000 vegades més concentrada que el punt d'unió inespecífica perquè n'hi hagi en excés (0.54mM).
4. A més de les diferents concentracions d'hormona radioactiva (CGP) també realitzarem diversos punts d'unió inespecífica amb propranolol. Cada incubació contindrà:

U inespecífica (-OE): 20  $\mu\text{l}$  de CGP- $^3\text{H}$  + 20  $\mu\text{l}$  propranolol + 480  $\mu\text{l}$  de membrana + 20  $\mu\text{l}$  tampó.

U inespecífica (+OE): 20  $\mu\text{l}$  de CGP- $^3\text{H}$  + 20  $\mu\text{l}$  propranolol + 480  $\mu\text{l}$  de membrana + 20  $\mu\text{l}$  d'OE.

U total (-OE): 20  $\mu\text{l}$  de CGP- $^3\text{H}$  + 480  $\mu\text{l}$  de membrana + 40  $\mu\text{l}$  tampó.

U total (+OE): 20  $\mu\text{l}$  de CGP- $^3\text{H}$  + 480  $\mu\text{l}$  de membrana + 20  $\mu\text{l}$  d'OE + 20  $\mu\text{l}$  tampó.

Els punts d'unió inespecífica es fan a les concentracions 0.05nM, 0.4nM, 5nM i 20nM.

5. La pre-incubació es prepara en tubs eppendorf posant cadascun dels components corresponents a cada punt excepte el CGP- $^3\text{H}$  deixant la membrana pel final. La membrana s'afegeix de tub a tub cada 40 segons.
6. Deixar pre-incubar amb l'OE durant 45 minuts.
7. Al minut 45 començar la incubació amb CGP- $^3\text{H}$ , posant-lo al seu temps corresponent a cada tub.

8. Al minut 90, i respectant el mateix ordre utilitzat per iniciar la incubació:
  - 8.1. Col·locar un filtre Millipore sobre la bomba de succió
  - 8.2. Buidar el contingut de l'ependorf sobre el filtre i rentar amb 10 ml de tampó Tris-HCl.
  - 8.3. Aturar la bomba de buit i retirar el filtre. Introduir-lo amb unes pinces dins un vial de centelleig que conté 4 ml de líquid de centilació.Aquest procés entre mostra i mostra ha de durar uns 40 segons, per no perdre el desfasament que hem fet en la incubació.
9. Contar els vials en un contador de centelleig  $\beta$ -1500 un cop vortejats.

## 2. EXPERIMENTS “*IN VIVO*”

### 2.1. ANIMALS I CONDICIONS D'ESTABILACIÓ

Els animals que s'han emprat en aquests treballs han estat en tots els casos rates de la soca Wistar (Harlan-Interfauna Ibérica, Sant Feliu de Codines, Barcelona), femelles i d'un pes aproximat entre 220-240 g. S'han mantingut estabulats en gàbies individuals amb un cicle d'il·luminació de 12 hores (de 08.00 a 20.00) amb unes condicions ambientals estàndard (temperatura de 20-22°C, humitat relativa entre 70-80%). La dieta (de manteniment A04, de Panlab, Barcelona) estava constituïda per un 55% de glúcids, 14% de proteïna i 2.5% de greixos. Tots els animals tenien accés lliure tant al pinso com a l'aigua.

Tots els protocols que s'han dut a terme amb aquests animals compleixen la normativa d'animals d'experimentació establerta per la UE, Espanya i Catalunya; i han obtingut l'aprovació del Comitè Ètic de Manipulació d'Animals d'Experimentació de la Universitat de Barcelona.

### 2.2. TRACTAMENTS AMB OLEAT D'ESTRONA

#### 2.2.1. DOSI D'OLEAT D'ESTRONA

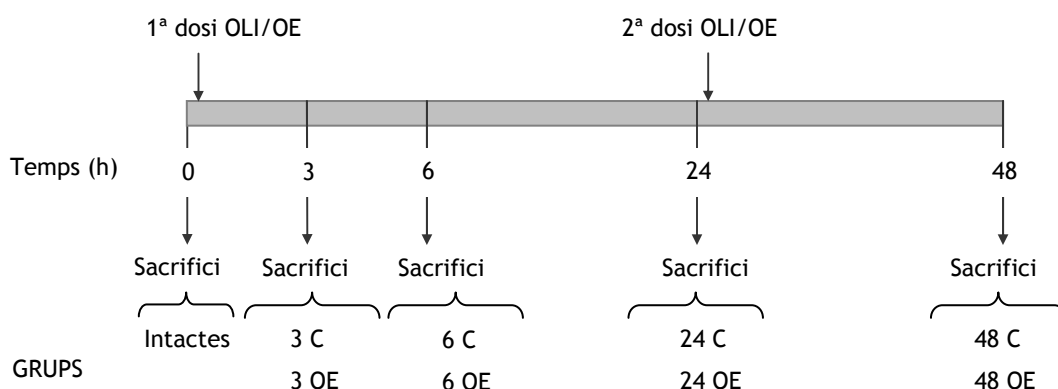
Per preparar les dosis d'OE pel tractament dels animals s'ha de tenir en compte el pes dels animals, la puresa de la substància, la durada del tractament i la quantitat d'animals a tractar. En tots els casos la dosi diària d'OE administrada ha estat de 10  $\mu$ mol per kg de

rata i s'ha administrat en un volum de 0.2 ml d'oli de girasol per via oral amb l'ajut d'una sonda intragàstrica.

Per a la correcta dissolució de l'OE en oli es pot fer una incubació de la barreja a 37°C o bé agitar-la suaument amb una vareta magnètica a l'agitador. Un cop preparada la solució es pot emmagatzemar tapada amb parafilm a -20°C fins el dia del tractament. És important assegurar-se que la dosi està temperada en el moment de la administració intragàstrica.

### 2.2.2. TRACTAMENT A TEMPS CURT

Per dur a terme aquest experiment es van utilitzar 48 animals que es van distribuir aleatòriament en 8 grups experimentals de 6 rates. La meitat van rebre una dosi diària d' OE (grups OE) en 0.2 ml d'oli de girasol i l'altra meitat van rebre només l'oli de girasol (grups C). Els grups eren sacrificats a diferents temps del tractament: 3, 6, 24 i 48 hores a comptar des de rebre la primera dosi. Es va realitzar també un grup intacte de referència al que no s'administrava cap tractament.



Les dosis s'administraven a primera hora del matí. Cal tenir en compte que els grups de 3, 6 i 24 hores havien rebut una única dosi i el grup de 48 hores havia rebut dues dosis.

Durant el període de tractament es va controlar diàriament el pes i la ingesta de l'animal.

En el cas dels experiments de recanvi de colesterol, el tractament a curt termini resultava igual encara que els temps de tractament van ser de 6 i 72 hores. En aquest cas les rates no es van sacrificar tal i com aquí es descriu, sinó que es procedia tal i com es pot veure en l'apartat recanvi de colesterol (apartat 2.5)

**SACRIFICI I OBTENCIÓ DE MOSTRES:**

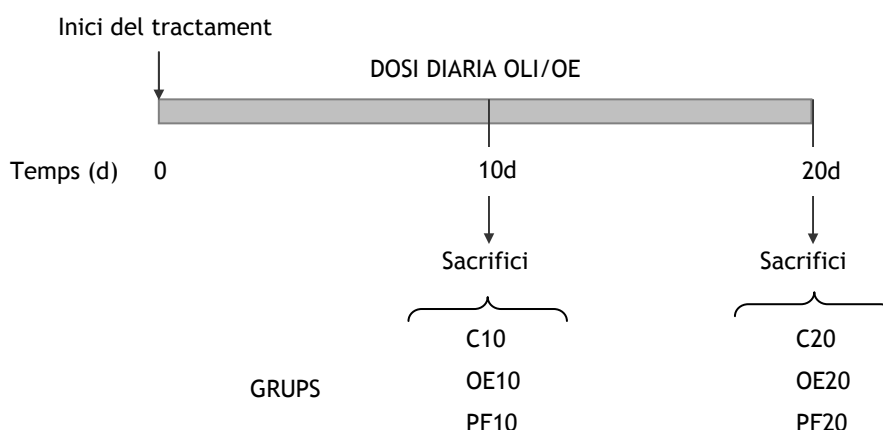
1. Un cop acabat el tractament corresponent en cada cas, l'animal es sacrificava per decapitació i es procedia a la recollida de mostres.
2. Es recollia la sang en un tub de plàstic de 50ml intentant recuperar-ne el màxim aplicant un lleuger massatge sobre el cos de l'animal. El tub es mantenia en gel fins al moment del processat.
3. Amb unes tisores s'obria el crani de l'animal i es treia el cervell, mantenint-lo sempre sobre un vidre sobre gel. Amb l'ajuda d'un bisturí es procedia a la dissecció de l'hipotàlem. Els hipotàlems es guardaven en tubs eppendorfs estèrils i es congelaven ràpidament amb nitrogen líquid.
4. S'agafaven mostres de teixits adiposos de diferents localitzacions: periovàric (POV), lumbar o retroperitoneal, subcutani (SC) i mesentèric. Les mostres es guardaven en eppendorfs estèrils i es congelaven ràpidament amb nitrogen líquid.
5. Les mostres de sang es centrifugaven a 13000 x rpm durant 15 minuts per obtenir el sèrum, que es mantenia a -20°C aliquidat fins el dia de les valoracions.
6. Totes les mostres de teixit obtingudes i congelades en nitrogen líquid es van emmagatzemar a -80°C.

**2.2.3. MODEL PAIR-FED**

Per tal d'estudiar si els efectes de l'OE sobre el metabolisme energètic eren deguts únicament a la disminució de la ingesta de l'animal es va dissenyar un experiment en el que es comparava l'efecte del tractament en animals tractats amb OE durant 10 i 20 dies amb animals alimentats amb la mateixa quantitat de pinso que ingerien els tractats (Pair-Fed).

Per aquest experiment 36 rates es van dividir aleatòriament en 2 grups. Un dels grups es va tractar durant 10 dies i l'altre durant 20 dies. Cada grup es va subdividir en 3 grups (6 rates per grup) com a conseqüència del tractament: un grup rebia una dosi diària intragàstrica de 0.2 ml d'oli de girasol amb 10 µmols d'OE per kg de pes de l'animal (grup OE); els altres dos grups rebien només la sonda intragàstrica d'oli de girasol, però un dels grups era alimentat *ad libitum* (Grup control, C) i l'altre grup tenia la ingesta limitada a la mateixa quantitat d'aliment que consumia el grup OE (grup Pair-Fed, PF).

Durant el període de tractament es va controlar diàriament el pes i la ingesta de cada rata. El grup d'animals PF es va mantenir dos dies desfasat de la resta dels grups per tal de poder subministrar la quantitat exacta de pinso que havien consumit el grup OE dos dies abans.



Tots els animal van rebre el tractament fins el dia abans del seu sacrifici.

### SACRIFICI I OBTENCIÓ DE MOSTRES:

1. Un cop finalitzat el tractament es va procedir al sacrifici dels animal. A dia 10 o 20 de l'inici del tractament els animals van ser sacrificats per decapitació i es va recollir la sang en tubs de plàstic de 50ml que es van mantenir en gel fins al moment del seu processament.
2. Ràpidament es va procedir a l'obtenció d'una mostra de fetge que es va pesar i guardar en un tub eppendorf que es congelava ràpidament amb nitrogen líquid. La resta del fetge es va pesar a la balança per estimar el pes de l'òrgan sencer.
3. El més ràpidament possible es van extreure els múscul *gastrocnemius*, *tibialis*, *soleus* i *extensorum digitorum longus (EDL)* de la pota dreta; es van pesar i guardar en tubs eppendorf estèrils. Igualment aquestes mostres es van congelar en nitrogen líquid.
4. Es va prendre mostres de teixits adiposos blancs (TAB) de diferents localitzacions : periovàric (POV) i lumbar o retroperitoneal. Les mostres es pesaven i guardaven en eppendorfs estèrils que es congelaven ràpidament amb nitrogen líquid. En aquest cas també es pesava la resta del teixit adipós que quedés a la carcassa de l'animal per estimar el pes del dipòsit adipós sencer.
5. També es van obtenir mostres de teixit adipós marró (TAM). Es va procedir d'igual manera que la resta de teixits adiposos.
6. Les mostres de sang es centrifugaven a 13000 x rpm durant 15 minuts per obtenir el sèrum, que es mantenia a -20°C al·lquotat fins el dia de les valoracions.



7. Totes les mostres de teixit obtingudes i congelades en nitrogen líquid es van emmagatzemar a -80°C.

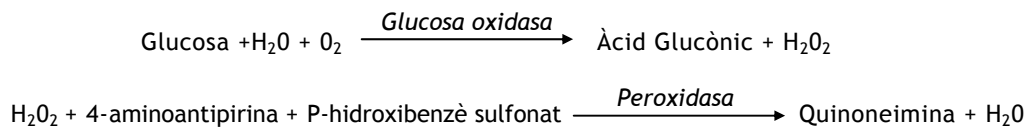
## 2.3. VALORACIONS PLASMÀTIQUES

### 2.3.1. METABÒLITS PLASMÀTICS

#### 2.3.1.1. Glucosa

La valoració de glucosa plasmàtica s'ha dut a terme amb el reactiu de Glucosa Sigma Diagnostics (Trinder) (Sigma Diagnostics, St. Louis, MO USA). El mètode de valoració està basat en el descrit per Trinder (1969), en el qual es proposava l'ús de la glucosa oxidasa i la peroxidasa acoblada a un acceptor d'oxigen cromogènic. En el cas del reactiu utilitzat es genera un producte de color amb absorbància màxima a 505nm, directament proporcional a la quantitat de glucosa present en la mostra. Per tant és un mètode i colorimètric que permet la determinació quantitativa de la glucosa en sèrum o plasma.

El sistema de reaccions acoblades és:



#### PROCEDIMENT:

Es va seguir el protocol indicat pel fabricant adaptant-lo a una valoració en microplaca de 96 pouets. Així doncs els volums utilitzats van ser:

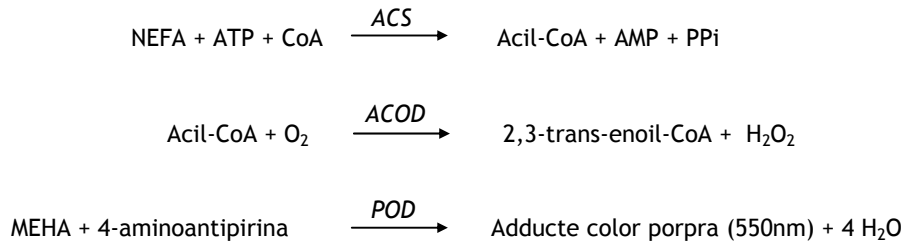
- a) Mostra / Estàndard glucosa 10 µl
- b) Reactiu de glucosa 100 µl

Les mostres i la patró s'han de fer per duplicat i s'ha de realitzar controls d'hemòlisi de cada mostra de sèrum substituint el reactiu de glucosa per aigua destil·lada.

#### 2.3.1.2. Àcids grassos lliures

Per la determinació d'àcids grassos no esterificats en sèrum s'ha utilitzat el kit Wako NEFA C (Wako Chemicals GmbH, Neuss, Germany). Es tracta d'un mètode enzimàtic i colorimètric basat en l'acilació del coenzim A (CoA) pels àcids grassos en presència d'acil-CoA sintetasa (ACS). L'acil-CoA produït és oxidat per l'acil-CoA oxidasa (ACOD), generant-se peròxid d'hidrogen, que en presència de peroxidasa (POD) permet la condensació oxidativa

del 3-metil-N-etil-N( $\beta$ -hidroxietil)-anilina (MEHA) amb 4-aminoantipirina. El producte, de color porpra, es mesura colorimètricament a 550nm.



**PROCEDIMENT:**

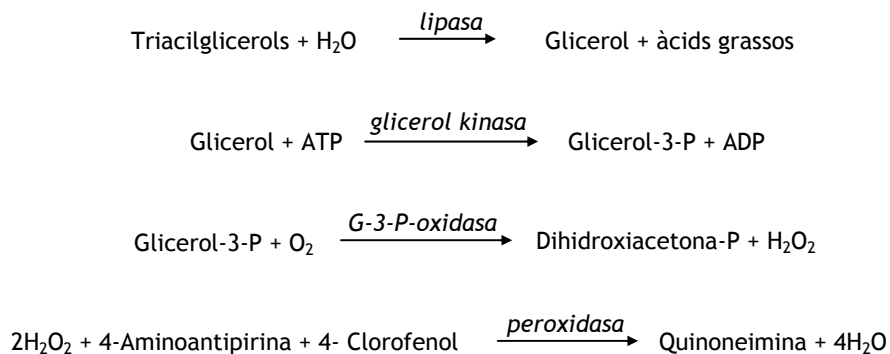
Es va seguir el protocol indicat pel kit comercial adaptant-lo a una valoració en microplaca de 96 pouets. Així doncs els volums utilitzats de cadascun dels reactius van ser:

- a) Mostra / Estàndard glucosa 5  $\mu$ l
- b) Reactiu A (ACS + CoA + ATP) 100  $\mu$ l
- c) Reactiu B (ACOD + POD) 200  $\mu$ l

Les mostres i la patró s'han de fer per duplicat i s'ha de realitzar controls d'hemòlisi de cada mostra de sèrum substituint el reactiu de glucosa per aigua destil·lada.

**2.3.1.3. Triacilglicerols**

Els triacilglicerols en sèrum s'han valorat amb el kit Triglycerides de BioSistems (Cod 11528) basat en les següents reaccions acoblades:



**PROCEDIMENT:**

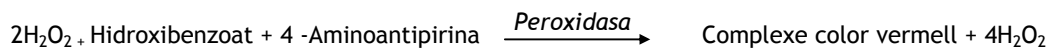
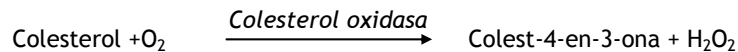
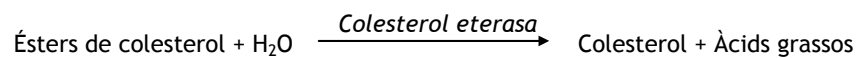
Es va seguir el protocol indicat pel kit comercial adaptant-lo a una valoració en microplaca de 96 pouets. Així doncs els volums utilitzats van ser:

- a) Mostra / Estàndard glucosa 10 µl  
 b) Reactiu de valoració 100 µl

Les mostres i la patró s'han de fer per duplicat i s'ha de realitzar controls d'hemòlisi de cada mostra de sèrum substituint el reactiu de valoració per aigua destil·lada.

#### 2.3.1.4. Colesterol total

El colesterol total en sèrum es va valorar amb el kit comercial Cholesterol Reagent Easy de Menarini (Firenze, Italia). El principi d'aquest mètode de valoració està basat en les següents reaccions enzimàtiques:



#### PROCEDIMENT:

Seguint el procediment indicat pel fabricant s'ha adaptat els volums per tal de realitzar la valoració en microplaca de 96 pous. Els volums utilitzats han estat :

- a) Mostra / Estàndard glucosa 10 µl  
 b) Reactiu de valoració 100 µl

Les mostres i la patró s'han de fer per duplicat i s'ha de realitzar controls d'hemòlisi de cada mostra de sèrum substituint el reactiu de valoració per aigua destil·lada.

#### 2.3.1.5. Colesterol HDL

El colesterol procedent d'HDL es va separar de la resta de colesterol del sèrum mitjançant el reactiu de precipitació de colesterol HDL de Randox, que consisteix en precipitar les lipoproteïnes més grans deixant en suspensió les HDL. Un cop aïllades la valoració del colesterol es va dur a terme paral·lelament amb la valoració del colesterol total, amb el mateix kit comercial.

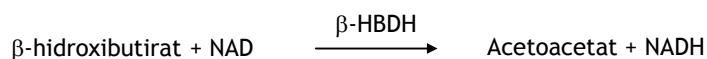
#### PROCEDIMENT

1. Incubar en tubs eppendorf durant 30 minuts 20 µl de mostra de plasma amb 40 µl de Precipitating Reagent (Randox).

2. Centrifugar a màxima velocitat en un minifuga de sobretaula refrigerada i obtenir el sobrenedant transparent.
3. La mostra ja està preparada per valorar el colesterol amb el kit de Menarini.

### 2.3.1.6. $\beta$ -hidroxibutirat

El  $\beta$ -hidroxibutirat en sèrum es va valorar amb el kit comercial de Sigma Diagnostics No 310-UV). El principi d'aquest mètode de valoració està basat en la oxidació del  $\beta$ -hidroxibutirat a acetoacetat catalitzada per la  $\beta$ -hidroxibutirat deshidrogenasa ( $\beta$ -HBDH):



Durant aquesta reacció el NAD es redueix a NADH de manera equimolar, produint així un increment en l'absorbància a 340 nm proporcional a la concentració de  $\beta$ -hidroxibutirat present a la mostra.

#### **PROCEDIMENT:**

Seguint el procediment indicat pel fabricant s'ha adaptat els volums per tal de realitzar la valoració en microplaca de 96 pous. Els volums utilitzats han estat :

- |                          |             |
|--------------------------|-------------|
| a) Mostra / Control      | 5 $\mu$ l   |
| b) Reactiu de valoració  | 300 $\mu$ l |
| c) Solució $\beta$ -HBDH | 5 $\mu$ l   |

Les mostres s'han de valorar per duplicat. La concentració de  $\beta$ -hidroxibutirat en la mostra de sèrum es calcula llegint l'absorbància a 340 nm abans i després d'afegir l'enzim que catalitza la reacció i calculant-ne la diferència.

### 2.3.2. HORMONES

#### 2.3.2.1. Insulina

La concentració plasmàtica d'insulina es va determinar per radioimmunoassaig (RIA) mitjançant el kit comercial Rat Insulin RIA, Cat.#RI-13K (Linco research, Inc; St. Charles, MO). Aquest mètode es basa en la competència que s'estableix entre la insulina no marcada de la mostra i una quantitat fixa d'insulina marcada amb  $^{125}\text{I}$  per un nombre limitat de llocs

d'unió a un anticòs anti-insulina, de manera que, quanta més insulina tingui la mostra, menys traçador podrà ser detectat.

La valoració d'insulina es va realitzar segons les instruccions del kit comercial utilitzant tubs de polipropilè i a partir de 100 µl de mostra de sèrum sense diluir. Per determinar l'hormona marcada unida a l'anticòs es va utilitzar un contador de radioactivitat gamma.

#### **2.3.2.2. Leptina**

La concentració plasmàtica de leptina es va determinar per radioimmunoassaig (RIA) mitjançant el kit comercial Rat Leptin RIA, Cat.#RL-83K (Linco research, Inc; St. Charles, MO). Aquest mètode es basa en la competència que s'estableix entre la leptina no marcada de la mostra i una quantitat fixa de leptina marcada amb <sup>125</sup>I per un nombre limitat de llocs d'unió a un anticòs anti-insulina, de manera que, quanta més insulina tingui la mostra, menys traçador podrà unir-se a l'anticòs.

La valoració d'insulina es va realitzar segons les instruccions del kit comercial utilitzant tubs de polipropilè i a partir de 100 µl de mostra de sèrum sense diluir. Per determinar l'hormona marcada unida a l'anticòs es va utilitzar un contador de radioactivitat gamma.

#### **2.3.2.3. Adiponectina**

La concentració plasmàtica d'adiponectina es va determinar per radioimmunoassaig mitjançant el kit comercial Mouse Adiponectin RIA (Linco research, Inc; St. Charles, MO).

La valoració d'adiponectina es va realitzar segons les instruccions del kit. Les mostres de sèrum es van diluir 1:1000 en tampó d'assaig. Per determinar l'hormona marcada unida a l'anticòs es va utilitzar un contador de radioactivitat gamma.

#### **2.3.2.4. Estrona lliure**

La concentració plasmàtica d'estrone lliure es va determinar per radioimmunoassaig mitjançant el kit comercial Estrone RIA, DSL-8700. Aquest kit es basa en el principi bàsic d'un immunossaig on competeixen la hormona marcada i no marcada per un nombre fix de llocs d'unió a un anticòs. La quantitat d'estrone marcada amb <sup>125</sup>I unida a l'anticòs és inversament proporcional a la concentració d'analit no marcat de la mostra. En aquest cas, la separació entre l'hormona unida i lliure es duu a terme amb un sistema de doble anticòs.

La valoració d'estrone lliure en es va realitzar segons les instruccions del kit comercial utilitzant tubs de polipropilè i a partir de 50 µl de sèrum sense diluir. Per determinar l'hormona marcada unida a l'anticòs es va utilitzar un contador de radioactivitat gamma.

### 2.3.2.5. Oleat d'estrone

La majoria de l'estrone present en plasma es troba esterificada amb diferents àcids grassos, però el més abundant és l'àcid oleic. Per tant, valorant les formes esterificades d'estrone es pot assumir que estarem valorant essencialment oleat d'estrone. Per valorar els esters d'estrone s'ha de realitzar un trencament de l'enllaç ester prèviament a la valoració d'estrone lliure (secció 2.3.2.6). D'aquesta manera obtindrem un valor d'estrone total (lliure+esterificada) del que podrem calcular la part corresponent a la forma esterificada en restar els valors de la valoració d'estrone lliure plasmàtics. El procés pel que s'alliberen els enllaços ester s'anomena saponificació.

#### 2.3.2.5.1. Protocol de saponificació

##### REACTIUS I MATERIALS:

- Cloroform:metanol (2:1)
- Agitador orbital
- MgCl<sub>2</sub> 3.9 mM
- Pipetes Pasteur de vidre
- KOH etanòlica
- Acetal d'etil

##### PROCEDIMENT:

1. Afegir 3 ml de cloroform:metanol (2:1) a 75 µl de plasma en un tub de Folch de 10ml i mantenir en agitació orbital durant 24 hores.
2. Afegir 1 ml de MgCl<sub>2</sub> 3.9 mM i deixar 15 minuts més en agitació orbital.
3. Centrifugar a 1500 rpm a 10°C durant 15 minuts, descartar la fase superior 1 per aspiració i passar la fase inferior 1 a un altre tub Folch de 10 ml. Evaporar a sequedat a 85°C (bany sec) i amb corrent de nitrogen i deixar refredar.
4. Afegir 1 ml de KOH etanòlica (dissoldre 0.7 g KOH 85% en unes gotes d'aigua i afegir 25 ml d'etanol absolut) i tancar el tub Folch (no hermètic). Mantenir-lo 20 minuts a 85°C amb agitació ocasional.

5. Deixar refredar a temperatura ambient.
6. Afegir 2 ml d'acetat d'etil i 1 ml d'aigua destil·lada. Agitar amb el vòrtex durant 1 minut cada tub.
7. Centrifugar a 1500 rpm a 10°C durant 10 minuts. Guardar la fase superior 2. A la fase inferior 2: afegir 2 ml d'acetat d'etil, agitar fort i centrifugar a 1000 rpm a 10°C durant 10 minuts.
8. Descartar la fase inferior 3 i afegir la fase superior 3 a la fase superior 1 (guardada anteriorment).
9. Afegir a aquesta nova fase (2+3) unes gotes d'indicador de pH. Neutralitzar amb una solució de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 M.
10. Centrifugar a 1500 rpm a 10°C durant 10 minuts. La fase inferior 3 es descarta i la fase superior 3 es passa a un tub de pyrex de 10 ml on s'evaporarà a sequedat a 55°C (en un bany sec) sota corrent de nitrogen.

L'extracte sec obtingut servirà per valorar l'estrone total mitjançant una adaptació del protocol del kit de RIA d'estrone.

#### *2.3.2.5.2. Protocol de valoració d'estrone total*

##### **REACTIUS I MATERIALS:**

- Tampó PBS:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  8 mM, NaCl 137mM, KCl 2.7mM. Ajustar el pH a 7.4 i afegir un 0.1% d'albumina lliure d'àcids grassos.
- Etanol absolut.

##### **PROCEDIMENT:**

1. Resuspendrer els extractes de les mostres obtinguts per saponificació del sèrum en 375  $\mu\text{l}$  d'etanol. (s'obté una dilució 1/5 de la mostra inicial)
2. Pipetejar 50  $\mu\text{l}$  de l'extracte lipídic en un nou tub de pyrex i afegir-hi 950  $\mu\text{l}$  de PBS. (s'obté una dilució 1/20 de la mostra inicial)
3. Preparar una recta patró amb estrone en les mateixes condicions que es troben les mostres, és a dir mantenint les mateixes proporcions d'etanol i tampó que s'han emprat per realitzar les dilucions dels extractes. A partir d'una solució mare d'estrone 1  $\mu\text{M}$  en etanol, i conservant el 5% d'etanol en la dilució, preparar els següents punts de patró d'estrone: 0, 0.125 nM, 0.37 nM, 1.1 nM, 3.32 nM, 14.6 nM.

4. A partir d'aquí el protocol utilitzat va ser el mateix que per valorar l'estrone lliure en plasma però partint de 50 µl de les dilucions de mostra/patró. (veure secció 2.3.2.6)

## 2.4. VALORACIONS A PARTIR DE MOSTRES DE TEIXIT DE RATA

### 2.4.1. VALORACIÓ DE DNA A PARTIR DE TEIXIT

La valoració de DNA dels teixits adiposos estudiats es va realitzar amb un protocol basat en el mètode fluorimètric descrit per Vytasek R (Vytasek R.A Anal Biochem. 1982 Mar 1;120(2):243-8).

#### REACTIUS:

- NaOH 1M
- NaOH 0.2M
- Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 10mM en NaOH 1M
- HClO<sub>4</sub> (PCA) 1M
- HCl 1M
- Àcid 3,5-diaminobenzoic (DABA) 20% (Sigma #11,383-2)
- DNA de timus de vedella 1mg/ml (Sigma)

#### PROCEDIMENT:

Aquest protocol es pot dividir en dos parts:

##### a) Homogeneïtzació:

1. Pesar 100mg de teixit en un tub de pyrex de 10ml i afegir 1ml de NaOH 1M. Guardar en gel.
2. Incubar al bany maria (100°C) durant 20 minuts tapant els tubs amb una bala de vidre per tal que s'evapori el mínim d'aigua possible. Remenar els tubs de tant en tant.
3. Refredar ràpidament els tubs en gel.
4. Diluir l'homogenat amb 4 ml d'aigua destil·lada i vortexar vigorosament.
5. Centrifugar a 1800 x g durant 15 minuts a 4°C.
6. Aliquotar l'homogenat evitant la capa superior de greix, i congelar els tubs eppendorf, que prèviament haurem foradat el tap amb una agulla, en nitrogen líquid.
7. Guardar a -80°C fins el dia de la valoració.



**b) Valoració:**

1. Preparar el REACTIU DABA: 1 volum DABA 20%:3 volums  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  10mM en NaOH 1M. Guardar a la foscor 60-90 minuts.
2. Preparar la patró de DNA de timus de vedella. A partir de la solució 1mg/ml es fa una dilució 1/10 en NaOH 5 mM, obtenint així una solució 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  que servirà per preparar la recta patró de la valoració. Preparar cadascun dels punts de la patró en tubs eppendorf per duplicat.

$\mu\text{g}$ DNA/ml	DNA 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ( $\mu\text{l}$ )	NaOH 0.2M ( $\mu\text{l}$ )
0	0	100
2,5	2,5	97,5
5	5	95
10	10	90
20	20	80
30	30	70
40	40	60
50	50	50
60	60	40

3. Incubar 100  $\mu\text{l}$  de l'homogenat del teixit o estàndard de DNA amb 100  $\mu\text{l}$  de la solució de PCA 1M durant 20 minuts i en agitació a 70°C.
4. Refredar els tubs ràpidament en gel.
5. Afegir 200  $\mu\text{l}$  del REACTIU DE DABA preparat prèviament.
6. Incubar durant 1 hora a 37°C amb agitació.
7. Refredar els tubs ràpidament en gel.
8. Centrifugar els tubs a temperatura ambient durant 3 minuts a 14000 x g.
9. Transferir 150  $\mu\text{l}$  del sobrenedant a tubs de pyrex i afegir 1,25 ml d'HCl 1M. Protegir els tubs de la llum amb paper d'alumini.
10. Llegir la fluorescència a  $\lambda_{\text{exc}}=410\text{nm}$  i  $\lambda_{\text{em}}=520\text{nm}$  en cubetes de vidre.

**2.4.1.1. Càlcul de cel·lularitat i massa cel·lular:**

A partir dels  $\mu\text{g}$  DNA/ml obtinguts, i basant-se en que una cèl·lula eucariota té una quantitat fixa de DNA (6 pg/cèl·lula), es pot calcular la quantitat de cèl·lules que té el teixit i quina massa cel·lular tenen seguint formules següents.

$$\frac{\mu\text{g DNA/ml} \times \text{Factor de dilució (5)}}{\text{Pes del fragment de teixit (0,1g)}} = \mu\text{g DNA / g teixit}$$

$$\mu\text{g DNA / g teixit} \times \text{Pes total del teixit (g)} = \mu\text{g DNA del teixit}$$

$$\mu\text{g DNA del teixit} \times \frac{10^6 \text{ cèl·lula}}{6 \mu\text{g DNA}} = \text{cel·lularitat del teixit (nº cèl·lules)}$$

$$\frac{\text{Pes total del teixit (g)}}{\text{nº cèl·lules}} \times \frac{10^9 \text{ ng}}{1\text{g}} = \text{Pes cel·lular (ng)}$$

#### 2.4.2. VALORACIÓ DE PROTEÍNA TISSULAR

La valoració de proteïnes es va dur a terme a partir d'un homogenat d'una mostra de 100mg de teixit en 1ml de NaOH 0.1N. Un cop fets el homogenats, la valoració de proteïna es duia a terme pel mètode de Lowry.

##### REACTIUS:

- NaOH 0.1N
- Coure alcalí : 148.8 mg  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$   
201.7 mg  $\text{Na}_2\text{EDTA}$   
0.3 ml NaOH 2 N

Portar-ho a 800ml de volum final amb aigua destil·lada (es pot guardar a la nevera durant 1 mes)

El mateix dia d'utilització s'afegeix:

- 20 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$
- 50ml NaOH 2N

Enrasar a 1000 ml amb aigua destil·lada

- Reactiu de Folin-Ciocalteu (Panreac)
- BSA 1% (10mg/ml)

##### PROCEDIMENT:

1. Per preparar la patró es parteix d'una dilució 1/10 de la mare de BSA 1% en NaOH 0.1N i es fan 5 punts de patró de concentracions: 0 mg/ml; 0.125 mg/ml; 0.250 mg/ml; 0.500 mg/ml i 1 mg/ml.

2. Pel que fa les mostres d'homogenats de teixit, aquestes s'han de diluir 50 vegades en NaOH 0.1N.
3. Afegir a cada tub 0,2 ml de patró / mostres (per duplicat) .
4. Afegir 2ml de reactiu Cu-alcalí i vortejar.
5. Incubar 20 min a temperatura ambient.
6. Preparar el Folin Ciocalteau fent una dil  $\frac{1}{2}$  amb aigua destil·lada a partir del Folin comercial.
7. Afegir a cada tub 0.2 ml de Folin i vortejar.
8. Incubar 15 minuts a temperatura ambient.
9. Passar la reacció a cubetes de plàstic de 5 ml.
10. Llegir l'absorbància a 500 nm a l'espectrofotòmetre.

#### 2.4.3. VALORACIÓ DE GLICOGEN TISSULAR

El glicogen de teixits es va valorar mitjançant el mètode de l'antrona. En funció del tipus de teixit (fetge o múscul), es va realitzar diferents dilucions de la mostra per tal que entressin dins el rang de la patró.

##### *MATERIAL:*

- Tubs de pyrex
- Morter de porcellana
- Caniques de vidre
- Vas de precipitats
- Bany sec
- cubetes de plàstic semimicro

##### *REACTIUS:*

- KOH 15 %
- Etanol absolut a 4 °C
- Nitrogen líquid
- H<sub>2</sub>O a 65 °C
- Solució d'antrona (antrona 0.1 % en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 84 %)
- Patró de glucosa: Glucosa 3.3 mM

### **PROCEDIMENT:**

#### **a) Extracció del glicogen:**

1. Fragmentar el teixit congelat amb un morter de porcellana i nitrogen líquid.
2. Pesat, en tubs de pyrex, uns 100 mg de teixit aproximadament i ràpidament afegir 1 ml de KOH al 15 %. En tot moment la mostra s'ha de mantenir congelada, doncs el glicogen es degrada amb molta facilitat.
3. Col·locar els tubs en un bany sec a 85 °C durant 20 minuts tapant-los amb les bales per evitar l'evaporació del KOH.
4. Finalitzada la digestió deixar refredar a temperatura ambient i afegir 1.5 ml d'etanol absolut fred (4 °C).
5. Agitar els tubs amb el vòrtex i guardar a -20 °C durant 24 hores.
6. Al dia següent tornar a agitar els tubs i centrifugar-los a 2000 rpm durant 20 minuts a 4 °C.
7. El sobrenedant resultant s'elimina i el pellet es resuspen en 1 ml d'aigua destil·lada prèviament escalfada a 65 °C.
8. Tornar a agitar els tubs, centrifugant-los de nou a 2000 rpm 20 minuts a 4°C.
9. El sobrenedant es decanta a un tub de pyrex nou i se li afegeixen 3 ml d'etanol absolut fred (4°C), descartant-se el pellet.
10. Els tubs s'agiten i es guarden a -20 °C, 24 hores.
11. Passat aquest temps els tubs es tornen a agitar amb vòrtex i es centrifuguen a 2000 rpm durant 20 minuts a 4 °C.
12. El sobrenedant es descarta i el pellet blanquinós (glicogen) es resuspen en 1.9 ml d'aigua destil·lada calenta (65 °C).

#### **b) Valoració de glicogen:**

Un cop extret el glicogen del teixit i resuspès en aigua, el glicogen es valora pel mètode de l'antrona.

Es prepara una patró de glucosa a partir d'una solució mare 3.3mM, realitzant dilucions 1:2 amb aigua destil·lada. Les mostres es dilueixen en aigua destil·lada en funció de la quantitat esperada de glicogen. Els factors de dilució aplicats en cada cas van ser:

GRUP	MÚSCUL	FETGE
OLI	1/2	1/20
OE	1/2	1/20
PF	1	1/8

1. En tubs de pyrex de 5 ml s'afegeixen 50 µl de mostra + 1 ml de solució d'antrona preparada en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 84%.
2. Es tubs s'incuben a 100 °C durant 10 minuts i es refreden en gel per tal d'aturar la reacció.
3. El contingut íntegre dels tubs es passa a microcubetes de plàstic i es llegeix l'absorbància a 550nm.

#### 2.4.4. VALORACIÓ DE LÍPIDS TISSULARS

Els lípids tissulars (múscul i fetge) es van extreure mitjançant una adaptació del mètode de Folch.

##### *MATERIAL:*

- Tubus de Folch de 15 ml
- Agitador orbital
- Balança de 3 decimals
- Centrífuga
- Motlles d'alumini
- Pinces
- Fornet elèctric
- Cotó fluix
- Embut de vidre

##### *REACTIUS:*

- Cloroform:metanol (2:1)
- NaCl 0.9 %

##### *PROCEDIMENT:*

1. Pesar 1g de teixit congelat en tubs Folch de 15 ml als que prèviament s'ha posat 10 ml de cloroform : metanol.
2. Mantenir tota la nit en agitació orbital a temperatura ambiental.

3. Filtrar el contingut dels tubs a través d'un cotó fluix en un nou tub de Folch al que afegirem 2 ml de NaCl 0.9%.
4. Agitar els tubs per inversió i col·locar-los en agitació orbital durant 30 minuts.
5. Centrifugar els tubs a 1500 rpm durant 10 minuts per tal d'obtenir una fase superior aquosa i una fase inferior orgànica.
6. Extreure amb una pipeta Pasteur la fase inferior orgànica i posar-la en motlles d'alumini prèviament pesats.
7. Col·locar els motlles sobre un forn elèctric a 80°C fins a obtenir un residu sec de color groguenc, que representarà el contingut lipídic de la mostra pesada.
8. Pesar els motlles en la mateixa balança que els hem tarat prèviament per obtenir la diferència de pes deguda als lípids.

D'aquesta manera s'obté lípids de la mostra:

$$\frac{\text{Pes final del motlle (g)} - \text{Pes inicial del motlle (g)}}{\text{Pes de la mostra (g)}} \times \frac{1000\text{g}}{1\text{Kg}} = \text{g lípid/Kg de teixit}$$

### 2.4.5. VALORACIÓ D'AIGUA TISSULAR

#### *MATERIAL:*

- Balança de 3 decimals
- Motlles d'alumini
- Pinces

#### *PROCEDIMENT:*

1. Pesar entre 100-300 mg de teixit en un motlle d'alumini prèviament pesat.
2. Secar durant 24 hores dins una estufa a 100°C.
3. Pesar el de nou els motlles amb el teixit deshidratat.

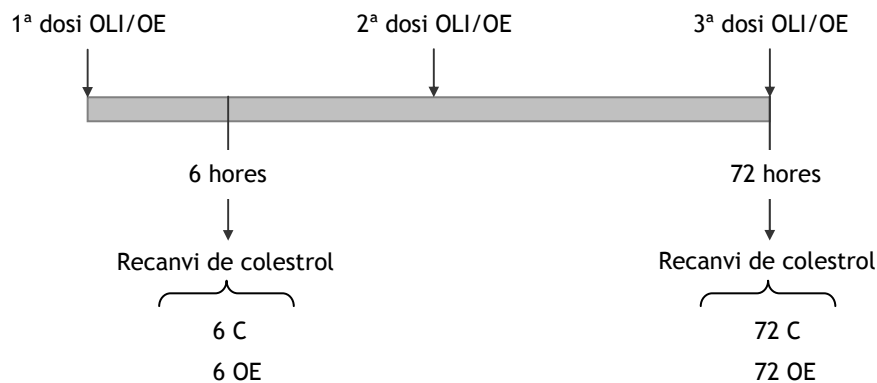
Per diferència s'obté el pes degut a l'aigua que conté la mostra i es pot calcular els grams d'aigua i el % que representa del pes humit.

### 2.5. RECANVI DE COLESTEROL

Per tal d'estudiar l'efecte de l'OE sobre el recanvi de colesterol plasmàtic es va realitzar un experiment en que es comparava el recanvi de colesterol lliure i esterificat de

rates Wistar tractades amb OE o oli de girasol després de 6/72 hores de tractament oral amb OE.

Per dur a terme aquest experiment es van utilitzar 24 animals que es van distribuir aleatòriament en 4 grups experimentals de 6 rates. La meitat van rebre una dosi diària d'OE (grups OE) en 0.2 ml d'oli de girasol i l'altra meitat van rebre només l'oli de girasol (grups C). L'experiment de recanvi es duia terme passades 6 i 72 hores a comptar des de rebre la primera dosi.



#### **PROCEDIMENT:**

##### Preparació del plasma carregat amb colesterol marcat

1. Sacrificar i exanguinar dues rates Wistar no tractades i intactes de 3 mesos d'edat per punció cardíaca.
2. Incubar el plasma durant 18 hores amb 13 kBq/mL (1 nmol) de colesterol marcat amb 3H (TRK330, Amersham Biosciences) a temperatura ambient per tal d'equilibrar la distribució del marcatge entre els diferents compartiments de la mostra de plasma.

##### Canulació i obtenció de mostres

1. Anestesiar la rata amb una injecció peritoneal de pentobarbital sòdic (50mg/Kg)
2. Un cop la rata ha perdut tots els reflexes iniciar la canulació de la vena jugular dreta amb una cànula P10 de plàstic.
3. Col·locar una cànula P50 a l'artèria caròtida esquerra.
4. Omplir les cànules amb salí heparinitzat.
5. Infusionar per la cànula de la vena jugular 0.20 ml del plasma de la rata donant (830 kBq/nmol de colesterol marcat, amb una activitat específica de 2.26 kBq/nmol pel colesterol lliure i 530 Bq/nmol pel colesterol esterificat)
6. Administrar seguidament un bolus de 0.1mL de salí per netejar la cànula.

7. Dos minuts després extreure una mostra de 0.4ml de plasma de l'artèria caròtida. Considerarem aquest valor com el valor inicial.
8. Continuar extraient mostres de l'artèria caròtida fins a 2 hores, en que la rata serà sacrificada.

Processat de les mostres

1. Centrifugar les mostres de plasma a 13000g per obtenir el plasma lliure de cèl·lules.
2. Realitzar una extracció lipídica amb cloroform:metanol (2:1 en volum) segons el mètode de Folch (secció 1.1.8.2) L'extracció es realitzava amb 0.2ml de plasma, 4 ml de cloroform metanol (2:1) i 0.64ml de solució salina.
3. Realitzar el contacte d'una mostra de l'extracte lipídic obtingut per valorar la radioactivitat total de colesterol.
4. Evaporar la resta de l'extracte en tubs de vidre sota corrent de nitrogen.

Cromatografia de capa prima per separar colesterol d'oleat de colesterol.

Per tal de quantificar el marcatge corresponent a cadascun dels pools de colesterol (colesterol lliure i esterificat), es fa una cromatografia en capa fina. La fase mòbil de la cromatografia serà hexà : èter dietílic : àcid acètic glacial (80:20:1). Es marcaran carrils en la TLC de sílica de 2.5 cm d'amplada, 10 cm de llargada, i carregant la mostra a 1.5 cm de l'extrem de la TLC (tal i com mostra a la figura 2)

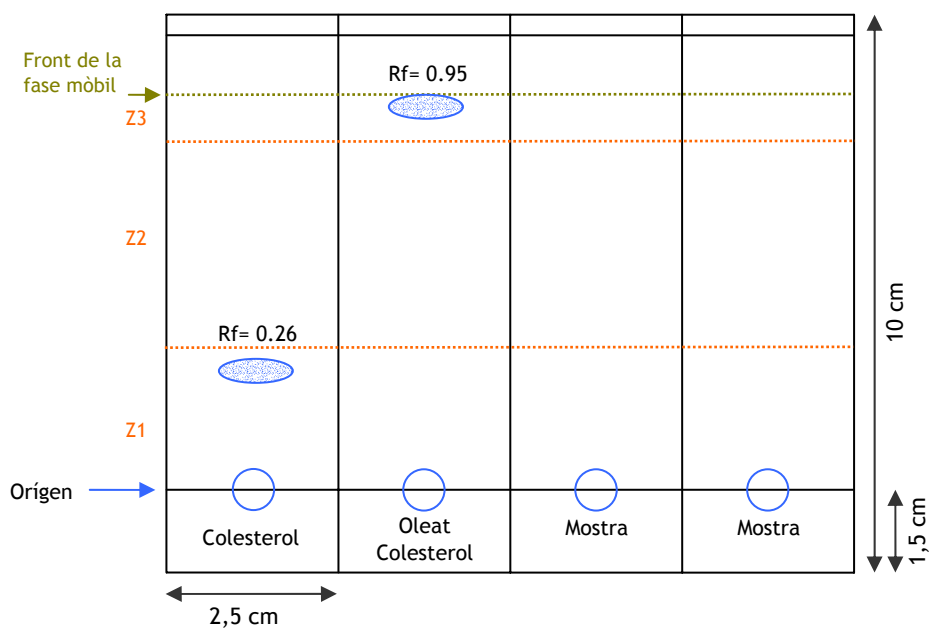


Figura 2: Esquema de la TLC i patró de cromatografia que s'obté.



1. En un dels carrils es carreguen al punt d'origen 20 µl de patró de colesterol 12.5mM en etanol i 20 µl d'oleat de colesterol 12,5 mM en diclorometà.
2. Carregar 20 µl de cada mostra a cadascun dels orígens dels carrils de la cromatografia.
3. Es deixa córrer la cromatografia dins una cubeta de vidre amb 78 ml de fase mòbil, fins que la fase mòbil arriba a 1.5 cm de la fi del carril. Deixar secar sota la campana de gasos.
4. Polvoritzar amb àcid fosfomolíbdic al 10% en metanol i deixar secar.
5. Incubar a l'estufa durant un minut a 150°C.
6. El resultat de la cromatografia mostra en color verdós l'alçada de la cromatografia on hi ha la patró de colesterol i l'oleat de colesterol, que ens indicarà la zona on es troben els productes marcats dels extractes de plasma. El colesterol lliure queda localitzat aproximadament a 1.7cm de l'origen mentre que l'oleat de colesterol va gairebé amb el front de la fase mòbil.
7. Retallar la cromatografia en les tres zones marcades en la figura 2. La zona 1 representarà el colesterol lliure, la zona 2 ens servirà per verificar que no hi hagi marcatge radioactiu i la zona 3 contindrà l'oleat de colesterol. Passar els fragments de sílica a un vial amb 10ml de líquid de centelleig.
8. Contar en un contador  $\beta$ -1500 la radioactivitat de cadascuna de les fraccions.

## 2.6. MANIPULACIÓ D'ÀCIDS NUCLÈICS

Els àcids nuclèics requereixen d'una manipulació fina i meticulosa. S'ha de tenir en compte la contaminació de la mostra, la seva integritat i la seva qualitat. La seva manipulació s'ha de realitzar sempre amb guants i el material ha de ser sempre estèril per evitar la contaminació externa de la mostra. S'han d'utilitzar sempre pipetes automàtiques calibrades i revisades periòdicament.

El DNA és una molècula de gran estabilitat però que requereix unes condicions especials de solubilitat, ja que les seves característiques físico-químiques li confereixen gran viscositat. Per tant per aconseguir la màxima precisió de treball s'ha de mantenir a concentracions força diluïdes que ens permetin fer poc error de pipeteig. L'emmagatzematge sol ser a 4°C o a -20°C per períodes llargs de temps, però en el cas del DNAC (DNA

complementari) és aconsellable mantenir-lo sempre a -20°C i evitar descongelacions innecessàries.

L'RNA, per contra, és una molècula molt sensible a l'acció de les RNAases (enzims de degradació de l'RNA). Per tant, s'ha d'evitar la seva degradació durant la manipulació i l'emmagatzematge. És essencial que tot el material i les solucions que hi entrin en contacte siguin lliures d'RNAases (*RNAse-free*). Les solucions d'aigua que s'usin per preparar dilucions o reaccions amb àcid nuclèic han de ser certificades sense activitats nucleases, o bé prèviament tractada amb DEPC.

### 2.6.1 EXTRACCIÓ DE DNA GENÒMIC DE TEIXITS

El protocol d'extracció de DNA genòmic de teixits està basat en el descrit en el "Current Protocols in Molecular Biology" (vol1, unit 2.2).

#### MATERIAL:

- Nitrogen líquid
- Tampó de lisi
  - Clorur sòdic 100mM
  - Tris-Cl pH 8
  - EDTA 25mM pH 8
  - SDS 0.5%
  - Proteïnasa K 0.1mg/ml (Cat.#76230Y USB, Cleveland, OHIO) (s'ha d'afegir poc temps abans a la solució, ja que és molt làbil)
- PBS
- Acetat d'amoni 7.5 M
- Etanol 70% i 100%
- Tampó TE a pH 8 (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA)
- Bany a 50°C amb agitació
- Fenol / Cloroform / alcohol isoamil (25:24:1)
- Ribonucleasa H 5.9 mg/ml

#### PROCEDIMENT:

Partim de mostres de teixits congelades en nitrogen líquid immediatament després del sacrifici del animal, que hem emmagatzemat al congelador a -80°C fins el moment de l'extracció del DNA.

1. Pesar 100 mg del teixit congelat i posar en un morter de porcellana mantenint-lo sempre en nitrogen líquid per tal que no s'arribi a descongelar.

2. Esmicolar amb cura fins que quedi en forma de pols procurant que no s'evapori mai del tot el nitrogen líquid.
3. Recollir el pols amb una espàtula prèviament refredada en nitrogen líquid i passar a tubs eppendorf de 2 ml.
4. Afegir, ràpidament per evitar la descongelaçió, 1.2 ml de tampó de lisi.
5. Incubar a 50°C amb agitació entre 12 i 18 hores amb els tubs ben tapats.
6. Afegir 2 µl de Ribonucleasa H a cada tub i incubar 1 hora a 37°C amb agitació.
7. Afegir un 1.2 ml de la solució de fenol/cloroform/isoamil alcohol.
8. Centrifugar els tubs durant 10 minuts a 1700 x g.
9. Transferir la fase aquosa (superior) a un nou tub i afegir 0.6 ml d'acetat d'amoni 7.5 M i 2.4 ml d'etanol 100%. El DNA hauria de precipitar ràpidament.
10. Centrifugar els tubs a 1700 x g durant 2 minuts.
11. Rentar el precipitat amb etanol 70%.
12. Decantar l'etanol i deixar secar a l'aire el precipitat de DNA.
13. Resuspèndre el DNA en 30 µl de TE fins que es dissolgui. Per facilitar la resuspensió es pot incubar a 65°C durant 1 hora.
14. Quantificar la solució de DNA amb l'espectrofotòmetre.

Les mostres de DNA genòmic s'han conservat congelades a -20°C, fins la seva utilització.

### 2.6.2. EXTRACCIÓ D'RNA DE TEIXITS

Per l'extracció de l'RNA es va fer servir el kit Tripure® Isolation Reagent (Boehringer Mannheim), basat en una millora del mètode d'aïllament d'RNA desenvolupat per Chomcynski i Sacchi (1987).

#### **REACTIUS:**

- Reactiu Tripure Isolation Reagent (Boehringer Mannheim)
- Cloroform
- Isopropanol
- Etanol 75%
- Aigua bidestilada estèril.

### **PROCEDIMENT:**

#### **Fase d' extracció de l'RNA del teixit:**

La quantitat de teixit de partida per l'extracció de l'RNA varia en funció del teixit, des de 400 mg en el cas dels TABs excepte 200 mg en TAB mesentèric, 200 mg quan es tracta de TAM, o entre 150 i 200 mg en el cas de l'hipotàlem (el pes total de l'hipotàlem)

En tots els casos es va seguir les indicacions del kit variant els volums dels reactius en funció del pes inicial de la mostra de teixit.

1. Peser la quantitat de teixit a processar i passar-lo a un morter de porcellana mantenint el teixit congelat en tot moment amb l'ajuda de nitrogen líquid. Transferir la mostra ràpidament al tub de polipropilè en el que prèviament haurem afegit 1ml de Tripure Isolation Reagent per cada 100 mg de teixit inicial. Mantenir els tubs en gel.
2. Homogeneïtzar amb politró la mostra no sobrepasant els 2 minuts per evitar que la mostra es sobreescalfi. Netejar amb cura la sonda del politró entre mostra i mostra per evitar contaminació.
3. Centrifugar l'homogenat a 12000 x g durant 10 minuts a 4°C .
4. Recollir el sobrenedant evitant la capa superior de greix (si n'hi ha) i passar un nou tub de polipropilè.

#### **Fase de separació:**

L'homogenat obtingut en l'anterior pas es pot guardar a -80°C fins a un màxim d'un mes abans de continuar amb la fase de separació.

1. Incubar l'homogenat durant 5 minuts a temperatura ambient per assegurar la dissociació dels complexos nucleoprotèics.
2. Afegir 0.2 ml de cloroform per cada ml de Tripure Isolation Reagent utilitzat per l'homogeneïtzació.
3. Tapar el tub i vortexar vigorosament durant 15 segons.
4. Incubar a temperatura ambient durant 10-15 minuts.
5. Centrifugar 12.000 x g durant 15 minuts a 4°C.

Després de la centrifugació obtindrem dos fases separades per una interfase blanca:

- Sobrenedant: Fase aquosa de color transparent formada per l'RNA. Representa un 60% del volum del Tripure Isolation Reagent utilitzat a l'inici.
- Interfase i infranedant: Interfase blanca i infranedant rosat que contindran la proteïna i el DNA de la mostra.

Aïllament de l'RNA:

1. Transferir el sobrenedant transparent (RNA) a nous tubs de polipropilè, tenint molta cura de no arrossegar l'interfase blanca.
2. Precipitar l'RNA de la fase aquosa afegint 0.5 ml isopropanol.
3. Tapar el tub i invertir-lo diverses vegades.
4. Incubar la mostra de 5-10 minuts a temperatura ambient per afavorir la precipitació de l'RNA.
5. Centrifugar la mostra a 12.000 x g durant 10 minuts a 4°C.
6. Descartar el sobrenedant decantant-lo per inversió.
7. Afegir 1 ml d'etanol al 75% per cada ml de Tripure Isolation Reagent inicial. En aquest pas l'RNA es pot guardar a -20°C fins a 1 any.
8. Vortexar el pellet en etanol per rentar-lo bé.
9. Centrifugar a 7500 x g durant 5 minuts a 4°C. Descartar el sobrenedant per decantació i eliminar el màxim d'etanol possible.
10. Deixar assecar les restes d'etanol a l'aire.
11. Resuspendre el pellet d'RNA en aigua bidestil·lada estèril. El volum dependrà del teixit de procedència de l'RNA i de la quantitat de partida. Així doncs: 400 mg de TAB es resuspenen en 15-20 µl d'aigua, 200 mg de TAB mesentèric en 20 µl d'aigua, 150-200 mg d'hipotàlem en 30 µl, i els 100 mg de TAM en 20 µl.
12. Per millorar la dissolució de l'RNA s'incuba de 10-15 minuts a 55-60°C.
13. Quantificar la solució d'RNA amb l'espectrofotòmetre.

Per a la seva correcta conservació, les mostres d'RNA s'han de guardar a -80 °C.

**2.6.3. QUANTIFICACIÓ D'ÀCIDS NUCLÈICS**

Per quantificar la concentració d'àcid nuclèic s'utilitzen cubetes de quars i es realitza la valoració en un espectrofotòmetre Shimatzu. Amb aquest protocol es realitza una doble lectura: a 260 nm, que és la longitud d'ona de màxima absorció dels àcids nuclèics, i a 280 nm, longitud d'ona d'absorció de les proteïnes. Així, es dilueix 1 µl de mostra d'àcid nuclèic en 500 µl d'aigua bidestil·lada estèril i se'n llegeix l'absorbància a 260nm i 280nm. La relació 260nm/280nm ens indica tant la puresa com la integritat del producte d'extracció. Una relació superior a 1.8 indica degradació d'àcids nuclèics i una relació inferior indica un

contingut proteic més elevat com menor sigui la relació. La concentració dels àcids nuclèics es calcula amb la següent fórmula:

$$\mu\text{g/ml} = (\text{DO}_{260\text{nm}} / \varepsilon) \times (500 \mu\text{l aigua} / 1 \mu\text{l mostra})$$

on  $\varepsilon$  (coeficient d'extinció molar) = 25  $\mu\text{l}/\mu\text{g}$  (per RNA i DNA de cadena senzilla)

20  $\mu\text{l}/\mu\text{g}$  (per DNA de doble cadena)

Un cop quantificats els àcids nuclèics es van igualar les concentracions de totes les mostres, en el cas de l'RNA es van portar a una concentració de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , i el DNA a 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

### 2.6.4. COMPROVACIÓ DE L'ESTAT DELS ÀCIDS NUCLÈICS

Un cop quantificats els àcids nuclèics resultants de l'extracció es va procedir a la comprovació del seu estat mitjançant una electroforesi en gel d'agarosa a l'1% (veure apartat 2.5.5.).

En el cas de l'RNA, es va carregar 1  $\mu\text{g}$  d'RNA en un gel d'agarosa a l'1% agarosa. El gel es va córrer a 90 volts durant 45 minuts i es va visualitzar al transil·luminador de llum ultraviolada per tal de comprovar la integritat dels RNAm ribosòmics 18s i 28s.

Pel DNA es va procedir d'igual forma però en aquest cas es va preparar el gel d'agarosa al 2%. Un cop corregut el gel es visualitzava la banda de DNA genòmic molt propera al pou.

### 2.6.5. ELECTROFORESI EN GEL D'AGAROSA

L'electroforesi en gel d'agarosa és un mètode estàndard per separar fragments d'àcid nuclèics. La mobilitat dels fragments de DNA/ RNA és inversament proporcional al logaritme del seu pes molecular. El factor més important en la separació és la mida del porus del gel, és a dir, la concentració d'agarosa. Rutinàriament s'ha utilitzat una concentració de l'1% (p/v) d'agarosa per RNA i del 2% (p/v) pels fragments de DNA productes de PCR.

#### SOLUCIONS:

- Solució de bromur d'etidi
- Agarosa SeaKem
- TAE 10x
- Tampó de càrrega 5x: Xilen cianol 0.025%, blau de bromofenol 0.025% en glicerol 50%

- Marcador de pes molecular de 100 bp (Roche)

*PROCEDIMENT (al 2% d'agarosa per gel de 50ml):*

1. Pesar 1 g d'agarosa i s'afegeixen 50 ml de TAE<sub>x1</sub> en un erlenmeyer de 150-200 ml.
2. Fondre l'agarosa en un microones i deixar refredar a temperatura ambient.
3. Preparar el suport del gel tancant els extrems amb cinta de pintor i col·locant la pinta (motlle per als pous).
4. Quan l'erlenmeyer es pugui agafar sense que cremi (aproximadament a 40°C) afegir el bromur d'etidi (2,5 µl de l'estoc a 10 mg/ml per un gel de 50 ml). Barrejar bé i llençar dins del suport tancat amb cinta de pintor i amb la pinta preparada.
5. Quan el gel s'ha solidificat treure la pinta i la cinta de pintor que segella els extrems del gel i col·locar a la cubeta d'electroforesi.
6. Afegir tampó TAE<sub>x1</sub> de manera que aquest cobreixi totalment el gel.

Preparació de les mostres:

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

## 2.7. VALORACIÓ D' APOPTOSI (LM-PCR)

Per estudiar els efectes de l'OE sobre l'apoptosi cel·lular, s'ha utilitzat la tècnica de LA *polymerase chain reaction* (PCR) mitjançada per lligació (Ligation Mediated – PCR o LM-PCR). Aquesta tècnica la varem posar a punt al nostre laboratori a partir del mètode descrit per en Staley (Staley K, J.Blaschke A, Chun J. Cell Death Differ. (1997) 4, 66-75), utilitzat per detectar processos apoptòtics que amb altres tècniques no es poden detectar. Això és degut a la alta sensibilitat que aquesta tècnica ofereix, ja que és capaç de detectar processos apoptòtics deguts al recanvi cel·lular propi del teixit. Aquesta tècnica es basa en

l'amplificació selectiva de fragments de DNA amb extrems roms i 5' fosforilats. Un oligonucleòtid parcialment de doble cadena anomenat *linker* (oligonucleòtids de 12 pb i 24 pb complementaris) es lliga al DNA genòmic. L'estructura no forforilada del *linker* assegura la seva lligació en una única orientació al DNA 5' fosforilat amb extrems compatibles. Un cop lligat, el DNA es tracta amb Taq Polimerasa per omplir els extrems protunderants 5'. Els oligonucleòtids de 12 pb s'alliberen i els de 24 pb serviran com a encebadors per la següent reacció de PCR, que provocarà en una amplificació exponencial dels fragments de DNA amb *linkers* als dos extrems.

### REACTIUS:

- Tampó TE
- T4 DNA lligasa (Invitrogen)
- Tampó de reacció de T4 DNA lligasa (Invitrogen)
- Taq DNA polimerasa (Invitrogen)
- Tampó de reacció Taq DNA polimerasa (Invitrogen)
- Mix de dNTP (10 mM de dATP, dGTP, dCTP i dTTP a pH neutre) (GeneCraft)
- Aigua lliure de nucleases
- MgCl<sub>2</sub> 50 mM
- Encebadors d'actina (forward 5' TACGTAGCCATCCAGGCTCT 3', reverse 5' GCTCGGTCAGGATCTTCATG 3')
- Oligonucleòtid de 24 bp (5'-AGCACTCTCGAGCCTCTCACCGCA-3')
- Oligonucleòtid de 12 bp (5'-TGCGGTGAGAGG-3')

### PROCEDIMENT:

#### Lligació:

1. Preparar en tubs de PCR una barreja que contingui:
  - 0.5 µg de DNA genòmic de la mostra
  - Tampó de reacció de T4 DNA lligasa (1X)
  - 0.5 nmols d'oligonucleòtid de 24 bp
  - 0.5 nmols d'oligonucleòtid de 12 bp
  - Aigua lliure de nucleases (fins a un volum final de reacció de 30 µl)
2. Mantenir a 55°C durant 10 minuts. Un cop arriba a 55 °C s'ha de reduir la temperatura de manera paulatina fins a 10 °C durant 55 minuts. Mantenir a 10 °C durant un mínim de 10 minuts.



3. Afegir als tubs 1,5 U de DNA lligasa i mantenir els tubs durant 12-16 hores a 16°C, per tal de dur a terme la lligació dels oligonucleòtids als fragments de DNA genòmic.
4. Diluir la mostra lligada fins a 5ng/µl afegint 70 µl de TE.
5. D'aquesta mostra s'ha de realitzar paral·lelament una PCR amb els encebadors d'amplificació de fragments internucleosomals i amb els encebadors d'amplificació d'actina genòmica (com a gen de referència).

PCR:

1. Preparar en tubs de PCR una barreja que contingui:
  - 35 ng de DNA lligat amb oligonucleòtids
  - Tampó de reacció de Taq polimerasa (1X)
  - 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>
  - 320 µM dNTPs (10mM de cada)
  - 124 pmols d'oligonucleòtid de 24 bp
  - Aigua lliure de nucleases (fins a un volum final de reacció de 99.5 µl)
2. Incubar durant 3 minuts els tubs a 72°C i afegir 2.5 U de Taq DNA polimerasa (5U/µl).
3. Programar el termociclador amb el següent programa d'amplificació:
  - 5 minuts 72°C
  - 30 cicles 94°C 1 minut  
72°C 3 minuts
  - 15 minuts 72°C
4. Mantenir el producte de reacció a 4°C.
5. Per amplificar el gen de referència (actina) realitzar una nova reacció de PCR (paral·lela a l'anterior) amb la següent barreja:
  - 5 ng de DNA lligat amb oligonucleòtids
  - Tampó de reacció de Taq polimerasa (1X)
  - 4 mM MgCl<sub>2</sub>
  - 500 µM dNTPs (10mM de cada)
  - 0.3 µM d'encebadors d'actina (forward i reverse)
  - 8 U Taq Polimerasa
  - Aigua lliure de nucleases (fins a un volum final de reacció de 100 µl)
6. Programar el termociclador amb el següent programa d'amplificació:
  - 32 cicles 94°C 1 minut  
65°C 1 minut  
72°C 30 segons
  - 5 minuts 72°C

7. Carregar 10 µl del producte en un gel d'agarosa al 2% (veure secció 2.5.5.)
8. Un cop digitalitzada la imatge del gel, tal i cop es detalla a la secció 2.5.5., quantificar les bandes corresponents als fragments internucleosomals de 200 pb i actina per tal de poder comparar les diferents mostres i determinar la quantitat d'apoptosi de cadascuna d'elles. L'actina s'utilitza per normalitzar les dades de fragmentació del DNA.

## 2.8. ESTUDI D'EXPRESSIONI GÈNICA

### 2.8.1. ARRAYS DE DNA

Per l'estudi dels canvis en l'expressió gènica deguda al tractament a OE, es va optar per començar amb una tècnica de "screening" que proporcionés una informació bàsica a partir de la qual ens basaríem per continuar l'estudi del mecanisme d'acció de l'hormona. Així doncs es va triar l'Atlas™ Rat Array 1.2 (BD-Clontech Laboratories) perquè era específic de rata i contenia gens implicats en múltiples accions metabòliques que el feien adequat per un primer procés de cribatge.

L'array seleccionat es comercialitza ja preparat per hibridar i inclou 1186 DNAC de gens de rata immobilitzats en una membrana de nylon carregada positivament. Els DNAC que conté la membrana han estat preparats per minimitzar problemes d'hibridació inespecífica i corresponen a fragments entre 200-600 pb que han estat amplificats de regions de l'RNAm que no contenen cues de poly-A, elements repetitius ni altres seqüències d'alta homologia.

Les mostres d'RNA utilitzades per hibridar les membranes dels arrays es van obtenir mitjançant una extracció d'RNA tal i com s'indica al punt 2.5.2. Mitjançant un primer pas retrotranscripció es van sintetitzar les sondes de cDNA marcades amb dATP-<sup>33</sup>P que es van utilitzar per hibridar les membranes. Un cop realitzats els rentats corresponents les membranes es van exposar en pantalles d'europi i es van escanejar els resultats. Mitjançant els programes de software adequats es van quantificar i analitzar les expressions de cadascun dels gens de l'array.

#### **MATERIAL I REACTIUS:**

*Components subministrats pel kit comercial de l'array de Clontech (ref. #634556)*

- Atlas™ Rat Array 1.2.
- Barreja de encebadors dels gens que conté l'array.

- 10X dNTP Mix (pensat per fer el marcatge amb dATP : 40 $\mu$ M dATP,5mM dCTP,dGTP,dTTP)
- Transcriptasa Reversa MMLV
- Tampó reacció 5X
- DTT (100mM)
- Barreja de terminació 10X (0.1M EDTA [pH 8.0], 1mg/ml glicògen)
- Cot-1 DNA.
- Aigua bidestilada estèril lliure de nucleases.
- Solució d'hibridació ExpressHyb (Clontech)
- Atlas NucleoSpin Extraction Kit (Clontech) que conté:
  - Col·lumnas NucleoSpin Extraction Spin
  - Tubs de col·lecció de 2ml
  - Tampó NT2
  - Tampó NT3 (Es suplementa amb etanol 95% abans d'utilitzar)
  - Tampó NE

*Llista de components no subministrats pel kit:*

- Mostres d'RNA extretes de teixit.
- Inhibidor de Ribonucleases (RNasin Ribonuclease Inhibitor) 40 U/ $\mu$ l (Promega)
- [ $\alpha$ -33] dATP (10 $\mu$ Ci/ $\mu$ l ; >2,500 Ci/mmol, Amersham #BF1001)(4 $\mu$ l/membrana)
- DNA d'esperma de salmó (Sigma)(53 $\mu$ l/membrana)
- Solució de rentat 1 (600ml/membrana)
  - 2 X SSC
  - 1% SDS
- Solució de rentat 2 (200ml/membrana)
  - 0.1X SSC
  - 0.5% SDS
- 2X SSC (200ml/membrana)

**PROCEDIMENT:**

*Síntesi de sondes a partir de l'RNA total:*

1. Treure del congelador el [ $\alpha$ -33P] dATP (10 $\mu$ Ci/ $\mu$ l ; >2,500 Ci/mmol).
2. Preparar una Barreja de Reacció (BR) per tots els tubs de reacció i un d'extra:  
Barrejar els següents components en un tub eppendorf a TEMPERATURA AMBIENT.:

Reactiu	Vol/reacció
5X Reaction Buffer	2 $\mu$ l
10X dNTP Mix	1 $\mu$ l
[ $\alpha$ -33P] dATP (10 $\mu$ Ci/ $\mu$ l ; >2,500 Ci/mmol)	3.5 $\mu$ l
DTT (100mM)	0.5 $\mu$ l
Volum total	7 $\mu$ l

3. Pre-escalfar el termociclador a 70°C.
4. Preparar un tub de termociclador per cada mostra d'RNA que contingui:

Reactiu	Vol/tub
RNA total	1-2 µl = 2-5 µg (2.5 µg/µl)
Encebadors	1µl
H2O bd estèril (en cas que calgui)	Fins a 3µl

5. Barrejar bé amb la pipeta i fer un spin breument a la centrífuga.
6. Incubar els tubs al termociclador pre-escalfat a 70°C durant 2minuts.
7. Reduir la temperatura del termociclador fins a 50°C i incubar els tubs durant 2 minuts més. Durant aquesta incubació afegir 1 µl MMLV RT i 1 µl de RNAsin per reacció a la BR. Barrejar amb la pipeta i guardar a temperatura ambient.
8. Un cop acabats els 2 minuts d'incubació a 50°C afegir 9 µl de BR a cada tub de reacció.
9. Barrejar el contingut dels tubs pipetejant, anant amb cura de no introduir-hi bombolles, i de seguida tornar-ho cap al termociclador. Incubar els tubs durant 25 minuts a 50°C.
10. Aturar la reacció afegint 1 µl de Barreja de Terminació 10 X.
11. Continuar amb la cromatografia de columna, però si és necessari es pot guardar a 4°C durant unes hores.

### Cromatografia en columna:

Purificació de les sondes de DNAC marcat de les restes de nucleòtids marcats no incorporats i els fragments de DNAC petits.

El primer que s'ha de fer és afegir l'etanol 95% a la ampolla del Tampó NT3 tal i com especifica a la mateixa ampolla.

1. Diluir la sonda sintetitzada fins a 200 µl de volum final amb Tampó NT2 i barrejar bé pipetejant.
2. Col·locar una columna NucleoSpin Extraction Spin en un tub de 2ml, i pipetejar la mostra a la columna. Centrifugar a 14000 rpm durant 1 minut. Reservar les restes per estimar l'eficiència de la retrotranscripció. Descartar el tub de 2ml en un recipient de residus radioactius.

3. Passar la columna a un nou tub de col·lecció de 2ml. Afegir 400µl de Tampó NT3 a la columna. Centrifugar a 14000 rpm 1 minut. Descartar les restes del rentat.
4. Repetir el pas 3 dues vegades més.
5. Transferir la columna a un tub de 1.5 ml de centrífuga. Afegir 100µl de Tampó NE i deixar que la columna s'empapi durant 2 minuts.
6. Centrifugar a 14000rpm durant 1 minut per eluir la sonda purificada.
7. Chequejar la radioactivitat de la sonda per centelleig líquid:
  - a. 2µl en 5ml de líquid de centelleig.
  - b. 5µl de rentat en 5ml de líquid de centelleig.
  - c. Multiplicar les contes pel factor de dilució 20.

Han de sortir entre 2-10 x10<sup>6</sup> cpm. La relació entre rentats/sondes ha de ser > 0.25-

0.3. Es poden guardar les sondes a -20°C fins el moment de la hibridació.

Hibridació de les sondes de cDNA al microarray:

1. Preparar una solució d'ExpressHyb i DNA d'esperma de salmó: Pre-escalfar 5ml d'ExpressHyb a 68°C per cada tub d'hibridació.
2. Escalfar 0.5mg (53µl/tub) el DNA d'esperma de salmó a 96-100°C durant 5 minuts, i ràpidament posar en gel.
3. Barrejar el DNA d'esperma de salmó desnaturalitzat amb la solució ExpressHyb. Guardar a 68°C fins el seu us.
4. Omplir el tub d'hibridació amb aigua destil·lada. Mular la membrana posant-la en un recipient ple d'aigua, i després posar-la dins el tub. Buidar d'aigua el tub; la membrana ha de quedar enganxada a la paret del tub sense fer bombolles d'aire. Afegir 5ml de la solució preparada al pas 1. Assegurar que la solució queda ben repartida per sobre la membrana. Fer ràpidament aquest pas perquè no s'assequi gens la membrana.
5. Prehibridar durant 30 minuts en contínua agitació a 68°C.
6. Preparar la sonda per la hibridació amb el següents passos:
  - Afegir a la sonda marcada 5µl de DNA Cot-1.
  - Incubar en un bany en ebullició durant 2 minuts exactes.
  - Posar ràpidament en gel durant 2 minuts.

7. Amb molt de compte de no tirar la sonda concentrada damunt la membrana directament, afegir la barreja preparada al punt 4 a la solució de prehibridació i l'array. Barrejar suaument.
8. Hibridar tota la nit en contínua agitació a 68°C. Si és necessari es poden afegir 2-3 ml més de ExpressHyb pre-escalfat per tub perquè es cobreixi bé tota la membrana.
9. Al dia següent pre-escalfar la Solució de Rentat 1(2xSSC, 1%SDS) i la solució de rentat 2 (0.1xSSC, 0.5%SDS) a 68°C.
10. Treure la solució d'hibridació i descartar-la en un contenidor de residus radioactius. Substituir-la per 200ml (80%) de Solució de rentat 1. Rentar 30 minuts a 68°C. Repetir aquest pas tres cops més.
11. Fer un rentat amb Solució 2 durant 30 minuts a 68°C.
12. Fer un últim rentat final de 5 minuts en 2xSSC a temperatura ambient.
13. Amb unes pinces, treure l'array del tub i deixar escórrer l'excés de solució de rentat. No deixar que s'assequi gens.
14. Immediatament cobrir la membrana humida amb film de plàstic i segellar de manera que no perdi líquid.
15. Exposar en una pantalla d'europi i 15 dies després escanejar amb un Storm 840 Phosphorimager (Molecular Dynamics).

### Anàlisi de les dades

La imatge generada per l'escàner es va analitzar i quantificar utilitzant el software Atlas Image 2.1 (Clontech). Aquest software permet col·locar una graella d'*spots* (punts) que faciliten la quantificació de les intensitats de cada gen de la membrana. Cada spot de la graella es va ajustar individualment a la intensitat de la membrana restant-ne el seu *background*.

Les dades d'intensitat resultants de la quantificació es van importar al software d'anàlisi GeneSpring 6.1 (Agilent). Aquest programa permet la normalització de les dades de diferents experiments, genera llistes de restricció i classifica funcionalment els gens diferencialment expressats.

Les dades es van normalitzar per membrana i per mostra. En la normalització per membrana cadascuna de les dades es va dividir per percentil 50 de totes les mesures de l'array, i la normalització de cadascuna de les mostres es va fer respecte de la mediana de les mostres controls. L'expressió de cadascun dels gens es representa com el *ratio* entre el valor obtingut pel tractament i el control després de la normalització de les dades.

Les dades es van filtrar utilitzant un llindar calculat mitjançant el Cross-Gene Error Model basat en les rèpliques de cada experiment. Les mesures amb intensitats superiors a aquest llindar són relativament més precises que les inferiors. Els gens que no superaven aquest valor es van descartar. Es van elaborar llistes dels gens diferentment expressats amb un *ratio* superior a 1.5 o inferior a 0.5 utilitzant les dades de dos animals per cada condició experimental. El tall a 1.5 i 0.5 va ser escollit tenint en compte que petits canvis en expressió gènica poden representar grans canvis a nivell cel·lular. D'aquestes llistes se'n va obtenir després una classificació funcional.

### 2.8.2. RT-PCR

Per l'estudi estudiar diferències a nivell d'expressió gènica degudes al tractament amb OE es va utilitzar la tècnica de la Reacció en Cadena de la Polimerasa (PCR) per amplificar el producte de DNAc que resulta de la retrotranscripció (RT) de l'RNA de les mostres. En el cas de les validacions dels gens obtinguts en l'array es va optar per la tècnica de la PCR en temps real, partint també del producte obtingut en la RT de l'RNA de les mostres. En les dues tècniques s'ha dissenyat prèviament els encebadors que serviran per amplificar selectivament un regió del gen d'interès mitjançant programes específics de disseny d'encebadors.

#### 2.8.2.1. Síntesi del DNAc (RT)

##### REACTIUS:

- Oligo (dT)<sub>15</sub> (40 µg/100 µl) (Roche)
- Mix de dNTP (10 mM de dATP, dGTP, dCTP i dTTP a pH neutre) (GeneCraft)
- Inhibidor de Ribonucleases (RNasin Ribonuclease Inhibitor) 40 U/µl (Promega)
- Transcriptasa reversa MMLV (200 U/ µl) (Promega)
- Tampó de reacció de la Transcriptasa Reversa MMLV 5X : 250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub> i 50 mM DTT.
- Aigua lliure de nucleases.

##### PROCEDIMENT:

1. Per tal de destruir estructures secundàries, es duu a terme un pas inicial en que s'incuben durant 5 minuts a 70°C una barreja formada per 2 µg d'RNA amb 40 µg d'oligo (dT) en un volum final de 10 µl que s'ajustarà amb aigua lliure de nucleases.
2. Passats els 5 minuts es refreden els tubs ràpidament en gel.

3. Es prepara una barreja de 15 µl per reacció que contingui: 200 U MMLV RT, 25 U RNAsin, 0.5 mM dNTPs i Tampó de MMLV RT 1X.
4. S'afegeixen els 15 µl de la barreja a cada tub i s'incuba la reacció a 42°C durant 60 minuts.
5. Es fa un spin per a recuperar tot el volum que hagi pogut quedar a les parets del tub i es guarda el producte de la reacció en alíquotes de 5 µl a -20°C. S'ha comprovat que aquest producte no es pot congelar i descongelar massa vegades, donat que en alguns casos pot ocasionar problemes en la reacció de PCR. Per tant és millor que es mantingui congelat fins el dia que es procedeixi a realitzar l'amplificació.

### 2.8.2.2. Disseny dels encebadors

#### a) PCR semiquantitativa

A partir del cDNA obtingut en la reacció de la RT, s'han amplificat fragment d'alguns gens d'interès, utilitzant encebadors específics. Per al disseny d'encebadors s'ha emprat el programa Primer 3 ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)). La seqüència de l'RNAm del gen es va buscar a la base de dades PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed>) i es va introduir al software de disseny d'encebadors fixant la Tm a 65°C i procurant un percentatge òptim entre 40-60%. De les seqüències obtingudes es van seleccionar les de 18-25 parells de bases i un cop comprovat que no formessin dímers entre elles es va assegurar l'especificitat de seqüència dels encebadors amb el Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Aquesta eina informàtica busca regions de similitud entre la seqüència donada i les seqüències de les bases de dades obtenint així les regions amb més percentatge d'homologia.

Les seqüències dels oligonucleòtids utilitzats per amplificar cadascun dels gens dels que s'ha quantificat l'expressió en aquest treball es detallen a continuació.

GEN	SEQÜÈNCIA ENCEBADORS (5'-3')	TAMANY AMPLICÓ (pb)	GENBANK GI
Bax	F: CGA GTG TCT CCG GCG AAT TG R: CAC CCT GGT CTT GGA TCC AG	291	8392964
Bcl-2	F: GTA CCT GCA GCT TCT TTC CCC R: AAG AAG GCC ACA ATC CTC CCC	471	8392973
Bid	F: GGC TAG CCG CTC CTT CTA TC R: AAG GTA CGT GGC ATG GAT GCC	642	12083630
Bcl-x <sub>L</sub>	F: CAG TGC CAT CAA TGG CAA CCC R: GAC CCC AGT TTA CCC CAT CC	273	13928721
Bad	F: CGG GAC AGG CAG CCA ATA AC R: ATT GCA CGC ACC GGA AGG AAC	508	12083656



Caspasa 3	F: TGC AGT CTG ACT GGA AAG R: TGT GGC TGC ATT GCA GGC AG	591	5213859
Caspasa 8	F: GAG CAC TGA AGG AGG GGA AG R: GCC CTT GTC CCC ATG TGA TAG	410	11560102
Caspasa 9	F: GGG TGC TGT CTA TGG CAC AG R: ACC TGG GAA GGT GGA GTA GG	311	13928871
TNF $\alpha$	F: AAAAAGATGGGGGGCCTCCAGAACTCC R: TCTTGATGGCGGAGAGGAGGCTGACTTTC	477	395369
PPAR $\beta$	F: TGGAAGCAGCTGGTGAACGG R: TGGGGAAGAGGTAAGGCTG	511	6981383
PPAR $\gamma$	F: GATGCACTGCCTATGAGCACTTC R: ATCAGCAACCATTGGGTCAGCTC	222	6981385
Ciclofilina	F: GCTGCAGACATGGTCAACCC R: CATGCTTGCCATCCAGCCAC	389	8394008

a) PCR en temps real

El disseny dels encebadors en aquest cas és molt similar a l'anterior. Bàsicament difereix en que la longitud de l'amplicó desitjat es fixa entre 75 i 150 pb.

En alguns casos els encebadors es va demanar a Applied Biosystems, on es poden obtenir encebadors i sondes predissenyats (Assay on Demand Gene Expression), pel que no es disposa de la seqüència exacta ni la mida de l'amplicó. Aquests són els casos dels gens analitzats amb la tecnologia TaqMan. En aquests casos adjuntem la referència.

GENS SYBR GREEN	SEQÜÈNCIA ENCEBADORS (5'-3')	TAMANY AMPLICÓ (pb)	GENBANK GI
FATP1	F: GTGCGACAGATTGGCGAGTT R: GCGTGAGGATACGGCTGTTG	106	50054323
ACC	F: AGGAAGATGGTGTCCCCTCTG R: GGGGAGATGTGCTGGGTCAT	145	6981167
FAS	F: CTTGGGTGCCGATTACAACC R: GCCCTCCCGTACACTCACTC	185	57889
TNF $\alpha$	F: GGCTCCCTCTCATCAGTTCCA R: GCTTGGTGGTTTGCTACGA	104	395369
FABP4	F: CCTTTGTGGGGACCTGGAAA R: TGACCGGATGACGACCAAGT	152	16758093
HSL	F: CCCATAAGACCCATTGCCTG R: CTGCCTCAGACACTCCTG	93	6981163
CPT1b	F: GTGCTGGAGGTGGCTTTGGT R: TGCTTGACGGATGTGGTTCC	152	1850589
GENS TAQMAN	REFERÈNCIA ASSAY ON DEMAND		ID GENBANK
LPL	Rn 00561482_ml	-	6981167
Ciclofilina	Rn 00690933_ml	-	8394008

### 2.8.2.3. PCR semiquantitativa

#### REACTIUS:

- Encebadors 3' i 5' (20  $\mu$ M)
- Taq DNA polimerasa BioTherm 5 U/  $\mu$ l (GeneCraft)
- Tampó de reacció x10 de la Taq Polimerasa BioTherm: 160nM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 670nM Tris-HCl (pH 8.8), 0.1% Tween 20.
- Mix de dNTP (10 mM de dATP, dGTP, dCTP i dTTP a pH neutre)
- $\text{MgCl}_2$  50 mM
- Aigua lliure de nucleases.

#### PROCEDIMENT:

1. Preparar una barreja de reacció que contingui tots els components en la concentració corresponent que s'indica per cada cas. El volum final de la reacció pot variar entre 25 i 50  $\mu$ l.
2. En tots els casos es va realitzar un pas de desnaturalització inicial de 2 minuts a 94°C, seguit del nombre corresponent de repeticions d'un cicle consistent en 1 minut de desnaturalització a 94°C, un pas d'1 minut d'anellament dels encebadors a la temperatura corresponent i una extensió de 30 segons a 72°C. Finalment es realitzava un últim pas d'extensió a 72°C.

GEN	DNAc (ng/ $\mu$ l)	Encebadors ( $\mu$ M)	Cicles	T <sup>a</sup> hibridació
PPAR $\beta$	0.5	0.5	34	65°C
PPAR $\gamma$	1	0.5	27	65°C
TNF $\alpha$	1.25	0.35	33	65°C
Bax	0.5	1	29	60°C
Bcl-2	1	0.2	32	65°C
Bid	0.5	1	31	65°C
Bcl-x <sub>L</sub>	1	1	32	65°C
Bad	0.5	0.1	30	65°C
Caspasa 3	1	0.2	30	65°C
Caspasa 8	0.5	0.5	31	65°C
Caspasa 9	1	0.5	30	65°C
Ciclofilina	0.5	0.1	23	65°C

3. El producte de PCR es mantenia a 4°C fins al moment de realització de l'electroforesi en gel d'agarosa que ens permetia visualitzar el resultat de l'assaig de PCR.

#### 2.8.2.4. PCR en temps real

La PCR en temps real que hem utilitzat en els experiments d'aquest treball és una tècnica semiquantitativa en que el producte de PCR s'analitza un moment d'amplificació en que encara hi ha relació entre el producte de partida i la quantitat d'amplicó sintetitzat. La diferència amb la PCR semiquantitativa convencional està en que la PCR a temps real permet la detecció del producte de PCR a mida que aquest s'acumula, i per tant, proporciona un mètode molt sensible per a la quantificació del nombre de còpies d'una mostra o la comparació dels nivells d'expressió entre diferents mostres.

En aquesta tesi s'ha utilitzat fonamentalment la fluorescència de *SYBR green*, però en el cas d'algun gen s'ha emprat la tecnologia TaqMan d'Applied Biosystems.

La primera de les metodologies utilitza el *SYBR green* per la seva capacitat d'unió a la doble cadena de DNA. Un cop unit, aquest incrementa la seva fluorescència en 1000 vegades més que quan es troba lliure. Així doncs, com més amplicons hi hagi a la mostra més marcatge fluorescent es registrarà. En aquest cas, una amplificació inespecífica no corresponent a l'amplicó desitjat, també generaria fluorescència. Per això s'ha de realitzar una corba de *melting* en la que el producte amplificat es sotmet a un increment de la temperatura per comprovar-ne el punt de fusió. En cas que només tinguem un sol producte d'amplificació s'ha d'observar un sol pic, corresponent a l'amplicó específic (figura 4).

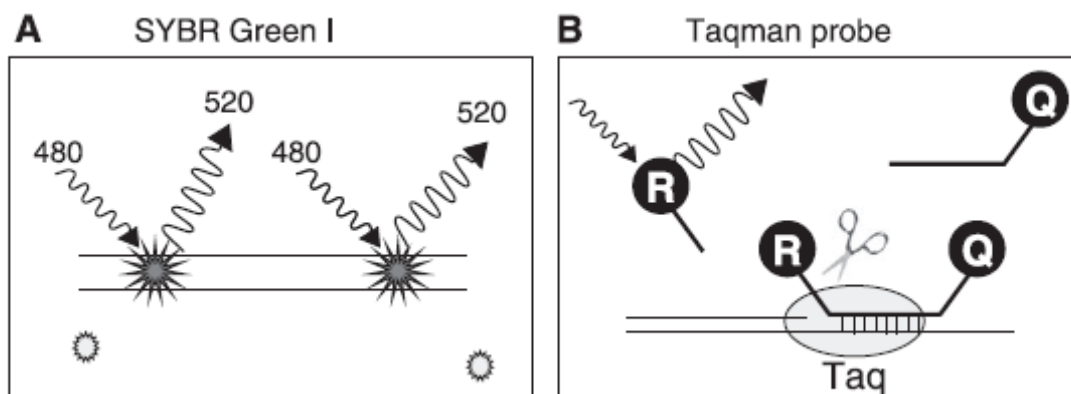


Figura 3. Química de la tècnica de la PCR en temps real. A. Longituds d'ona de les fluorescències del SYBR green. B. Funcionament de les sondes TaqMan. R: *reporter*, Q: *quencher* (Valasek i Repa, 2005)

La tecnologia TaqMan es basa en la utilització d'una sonda consistent en un oligonucleòtid que porta unides dos tipus de molècules: un marcador fluorescent (o *reporter*) al seu extrem 5' i un reductor de l'emissió (o *quencher*) a l'extrem 3'. Mentre la sonda es troba intacta, la proximitat del *quencher* redueix enormement la fluorescència emesa pel *reporter* pel fenomen FRET (*Förster resonance energy transfer*) (figura 3).

### REACTIUS I MATERIALS:

- iCycler iQ (Bio-Rad)
- Barreges de sonda TaqMan i encebadors (Applied Biosystems) / Encebadors
- iQ Supermix (Bio-Rad)/ iQ SYBR Green Supermix (Bio Rad)
- Microplaca de PCR de 96 pous (Axygen Scientific)
- Optical adhesive covers (Applied Biosystems)
- Aigua lliure de nucleases

### PROCEDIMENT:

1. Preparar dilucions 1/40 de les mostres de producte de DNAC obtingut en la reacció de RT.
2. Realitzar paral·lelament, de cada grup de mostres, una mostra representativa de la que farem dilucions seriades per tal d'estimar-ne l'eficiència.
3. Pipetejar els components de cadascuna de les reaccions a la placa tenint en compte d'afegir un control negatiu de cadascun dels gens per comprovar l'absència de contaminacions dels reactius:
  - 3.1. En el cas dels gens analitzats amb *SYBR green* la reacció consta de:
    - 10 ng de DNAC
    - 300 nM de cada encebador (*forward* i *reverse*)
    - 1X iQ SYBR Green Supermix
  - 3.2. En el cas dels gens analitzats amb la tecnologia TaqMan la reacció consta de:
    - 10 ng de DNAC
    - 1X barreja de sonda TaqMan i encebadors
    - 1X iQ Supermix
4. Col·locar l'adhesiu per tancar els pous de la placa i col·locar al termociclador.

5. Amplificar en l'iQ Cycler amb el següent programa d'amplificació: desnaturalització inicial de 3 minuts a 95°C, 40 cicles d'amplificació de 30 segons de desnaturalització a 95°C i 1 minut d'anellament i extensió a 60°C. En el cas dels gens analitzats amb *SYBR green* es realitzava una corba de *melting* al finalitzar la reacció d'amplificació.
6. El producte de PCR es mantenia a 4°C fins al moment de realització de l'electroforesi en gel d'agarosa per comprovar que el producte amplificat tenia el pes molecular corresponent a l'amplicó esperat.

#### 2.8.2.4.1 Quantificació relativa de l'expressió gènica

En aquesta tesi s'ha utilitzat un mètode de quantificació relativa del nombre de còpies de cada missatger. Aquesta és una mesura semiquantitativa que utilitza un control endogen com a element normalitzador.

La reacció de PCR en temps real es caracteritza pel cicle en que l'amplificació d'una determinada quantitat de producte es detecta per primer cop, enlloc de per la quantitat de producte acumulat després d'un nombre determinat de cicles. Així, quantes més còpies del nostre producte tingui la mostra a l'inici de la reacció, menys cicles necessitarà per detectar un increment significatiu de la fluorescència monitoritzada. Durant els primers cicles d'amplificació es detecten pocs canvis en la fluorescència, és el que es defineix com la línia base. Un cop la fluorescència incrementa per sobre de la línia base indica la detecció de producte amplificat. Així, empíricament es fixa un llindar (*threshold*) de fluorescència per sobre de la línia base. El paràmetre  $C_T$  (cicle llindar o *threshold cycle*) es defineix com el cicle en el que la mostra assoleix el valor de fluorescència del llindar. Aquest serà el paràmetre que utilitzarem per realitzar la quantificació, com més petit sigui el  $C_T$  major serà la quantitat d'expressió del gen d'interès.

La relació entre el  $C_T$  del gen desitjat i el gen control ens proporcionarà un  $CT$  normalitzat de la diana. Però aquesta quantificació serà possible sempre i quan s'hagi fet abans la comprovació que les eficiències d'amplificació dels dos gens a comparar siguin equivalents. Per això s'amplifiquen dilucions seriades de l'ADNc amb cadascun dels encebadors dels gens. En representar el logaritme de la concentració inicial del motlle enfront del  $C_T$ , la pendent de les rectes obtingudes pel gens han de ser iguals i pròximes a 1.

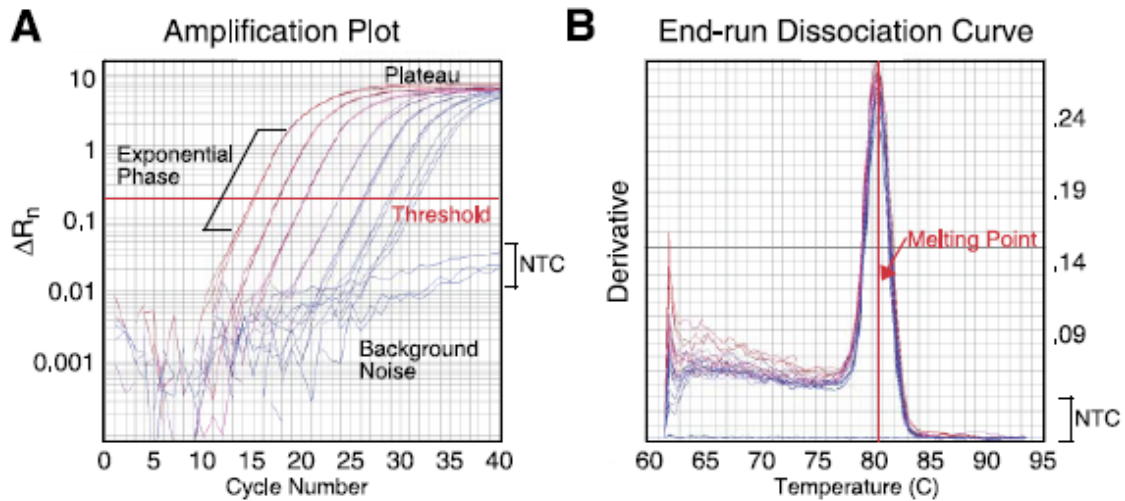


Figura 4. Resultats típics de la real-time PCR. A: Gràfic d'amplificació que mostra l'amplificació de la senyal fluorescent (eix y) amb cada cicle de PCR (eix X). Es marca el Threshold fixat en la fase exponencial, el soroll de fons que es troba en la línia base i el plateau al que arriba finalment la reacció. Observem el NTC (*blanc sense mostra*) com no generen senyal i com els reactius no es troben contaminats. B: Corba de dissociació que només ens mostra un sol pic, suggerint així que només hi ha un producte específic de PCR (Valasek i Repa, 2005)

#### 2.8.2.4.2 Anàlisi dels resultats

El gen control utilitzat en aquests experiments ha estat la ciclofilina. Un cop obtingudes les dades de  $C_T$  corresponents al gen d'interès i el control la manera de comparar aquestes dades consisteix en la fórmula segons la qual, la quantitat del gen d'interès normalitzada pel gen control i relativa al grup de referència ve donada per:

$$2^{-\Delta\Delta C_T}$$

$$\text{on } \Delta\Delta C_T = \Delta C_T (\text{mostra}) - \Delta C_T (\text{grup referència})$$

$$\Delta C_T (\text{mostra/grup de referència}) = C_T (\text{gen interès}) - C_T (\text{gen control})$$

S'utilitza com a grup de referència el grup d'animals controls no tractades.

## **IV. RESULTATS**





## **BLOC I**

---

### **EFFECTES DE L'OLEAT D'ESTRONA "IN VITRO"**



***1. Aproximació a la Identificació del Mecanisme d'Acció de  
l'Oleat d'Estrona en Adipòcits 3T3-L1***



## INTRODUCCIÓ

El nostre equip d'investigació té una llarga experiència de treball amb l'oleat d'estrona (OE), administrat als animals d'experimentació en condicions diverses (Grasa i col, 2000; Balada i col, 1997; Balada i col, 1997; Sanchis i col, 1996). Així doncs, si bé a l'inici d'aquest treball coneixíem força quins eren els efectes del tractament amb OE, encara desconeixíem quin era el mecanisme mitjançant el qual es duien a terme. Un dels punts claus en l'acció de l'OE és la pèrdua de pes que provoca el tractament, que implica específicament pèrdua de teixit adipós. Per tant, el més probable és que es produeixi una activació de la lipòlisi en teixit adipós amb la finalitat de mobilitzar les reserves de triacil-glicerols acumulades. Malgrat això, els nivells plasmàtics no semblaven indicar aquesta mobilització en el moment del termini del tractament estàndard (10 dies), ni tan sols es detectaven variacions en períodes de poques hores de tractament (Cabot i col, 2005). També sabíem que l'OE augmentava la capacitat de resposta del teixit adipós als estímuls adrenèrgics, amb valors d'AMPc més elevats després d'una estimulació amb un agonista  $\beta$ -adrenèrgic, així com l'augment de l'expressió de receptors  $\beta$ -adrenèrgics al teixit adipós marró (Cabot i col, 2001). A partir d'aquesta premissa, es van fer proves per avaluar l'efecte de l'OE sobre l'activitat lipolítica amb uns kits de preadipòcits subcutanis humans (Zen-Bio Inc, Triangle Park, NC) provinents de liposuccions. Inicialment els resultats van indicar que l'OE provocava un increment de la lipòlisi i ens va fer pensar que l'OE podria actuar en la cascada d'activació de la HSL; i fins i tot que l'OE podria arribar a actuar a través dels receptors adrenèrgics. Malauradament, la manca d'homogeneïtat dels preparats cel·lulars va fer que els resultats no fossin reproduïbles i ens va fer veure que potser s'havien introduït massa artefactes en el procediment. De tota manera no deixava de sorprendre'ns el fet que un compost d'origen esteroideu pogués actuar per una via adrenèrgica. Per aquesta raó es va intentar repetir aquesta mena d'experiments treballant en cèl·lules de teixit adipós de rata o bé en cultius de cèl·lules 3T3-L1. Aquestes cèl·lules derivades dels fibroblasts d'origen murí, quan s'incuben en presència de les hormones adequades es diferencien en adipòcits.

## RESULTATS:

### a) Possible mecanisme d'acció : receptors adrenèrgics

Els experiments que es van fer van ser incubacions a diferents temps de cèl·lules 3T3-L1 en presència d'un medi amb OE. Posteriorment es determinava els nivells de glicerol alliberat al medi (Hong i col, 2002) o la quantitat d'AMPc intracel·lular.

La senzillesa de l'enunciat va tenir, però, diferents dificultats. La més important fou la manca de solubilitat de l'OE, doncs de fet és una cera insoluble en solucions aquoses. Per

això es va haver de presentar dissolt en etanol o bé incorporat en una preparació de liposomes (Intralipid®) .

A la figura 1, es representa una resposta típica de les incubacions: l'alliberació de glicerol, com a marcador de lipòlisi no varia gairebé gens davant variacions de 4 ordres de magnitud en la concentració de l'OE, malgrat que la incubació en presència d'isoproterenol, agonista dels receptors  $\beta$ -adrenèrgics, utilitzat com a control positiu, indueix una clara activació de la resposta lipolítica. En el cas dels resultats aquí mostrats el temps d'incubació va ser 1 hora, però aquest comportament es va reproduir en tots els temps d'incubació emprats (0.5-16 hores). D'aquesta mateixa manera, tant si la forma de presentació de l'OE era en dissolució etanòlica com si era en una solució de liposomes, els resultats obtinguts van ser similars.

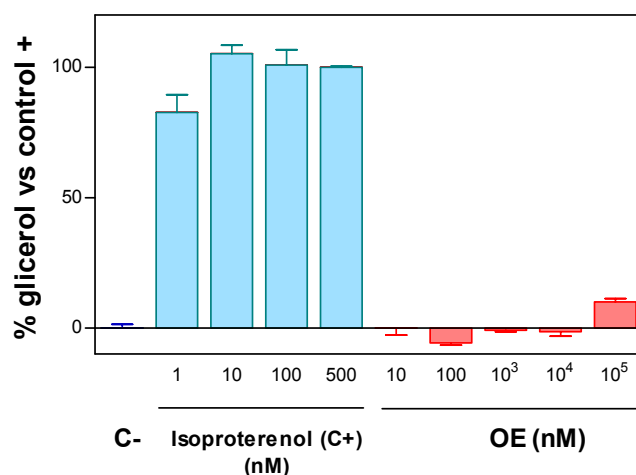


Figura 1. Alliberació de glicerol al medi de cultiu de cèl·lules 3T3-L1 incubades durant 1 hora en presència d'etanol (C-), diferents concentracions d'isoproterenol (C+) i d'OE solubilitzat en etanol. Les concentracions estan expressades en nM. El glicerol alliberat es representa en percentatge de glicerol determinat en el medi de cultiu respecte de l'alliberat en el medi del C+ (isoproterenol 500nM) i restant el C-. Els valors d'aquesta figura són les mitjanes (de 2 o 3 experiments diferents) amb els seus errors estàndard representats per barres verticals.

Per a completar l'experiment, es van mesurar els nivells cel·lulars d'AMPc, intermediari de la resposta lipolítica. També es va poder constatar que el comportament dels medis en que hi havia OE, no variava la resposta en relació a la resposta del control negatiu, tot el contrari del que passava amb l'isoproterenol (figura 2).

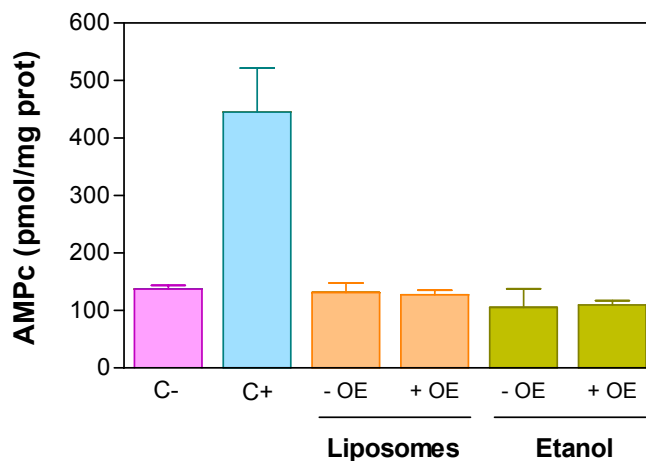


Figura 2. Nivells d'AMPc intracel·lular en cèl·lules 3T3-L1 després d'una incubació de 3 minuts en presència d'una solució de liposomes/etanol en presència o absència d'OE. Pel control positiu (C+) s'utilitza l'isoproterenol i el control negatiu només conté medi d'incubació. Els valors estan expressats com els pmols d'AMPc determinats dins la cèl·lula per RIA per unitat de proteïna cel·lular. Els valors d'aquesta figura són les mitjanes (de 2 o 3 experiments diferents) amb els seus errors estàndard representats per barres verticals.

Els experiments realitzats en adipòcits aïllats de rates Wistar femelles procedents de teixit adipós periovaric tampoc van donar resultats esperançadors en aquest sentit (resultats no mostrats).

Això ens permet dir que no sembla que l'acció de l'OE impliqui una acció directa de la lipòlisi en aquests models experimentals.

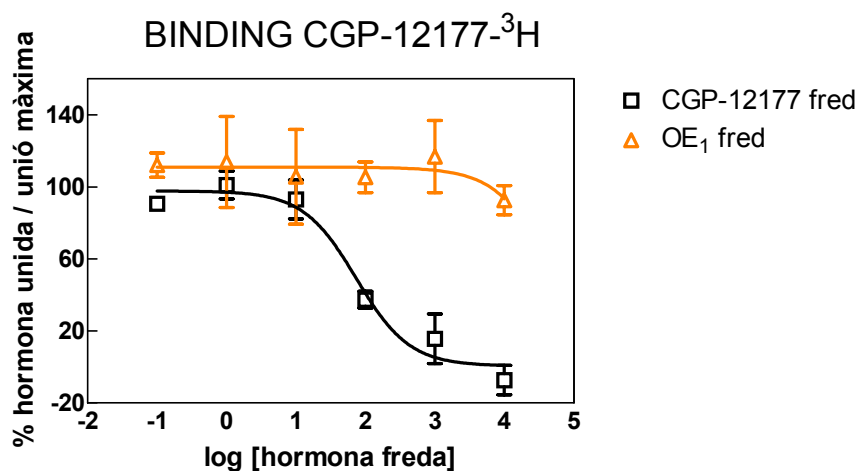


Figura 3. Estudi de competició pel lloc d'unió a receptors  $\beta$  de membrana aïllada de teixit adipós blanc epididimal de rata. En l'experiment es va afegir CGP i OE freds per tal d'observar el desplaçament de CGP-12177-3H que causaven.

D'altra banda també es va comprovar que l'OE no tenia la capacitat de desplaçar del lloc d'unió de agonista d'alta afinitat dels receptors  $\beta 1$  i  $\beta 2$  (CGP-12177) i antagonista  $\beta 3$ , mitjançant tècniques de "binding" a receptors adrenèrgics  $\beta 1$  i  $\beta 2$  de membranes aïllades d'adipòcits/eritròcits de rata o amb receptors  $\beta 1$  i  $\beta 2$  comercials purificats humans. En la figura 3 es mostra una corba de competició entre l'agonista CGP-12177 i l'OE pels receptors de membrana aïllada de teixit adipós de rata. Els resultats posen de manifest que així com a mida que augmenta la concentració de CGP fred es va desplaçant el CGP-3H unit a membrana, no passa el mateix en pujar la concentració d'OE fred. Així doncs l'OE no desplaça l'agonista/antagonista de cap dels receptors  $\beta$  de la membrana adiposa.

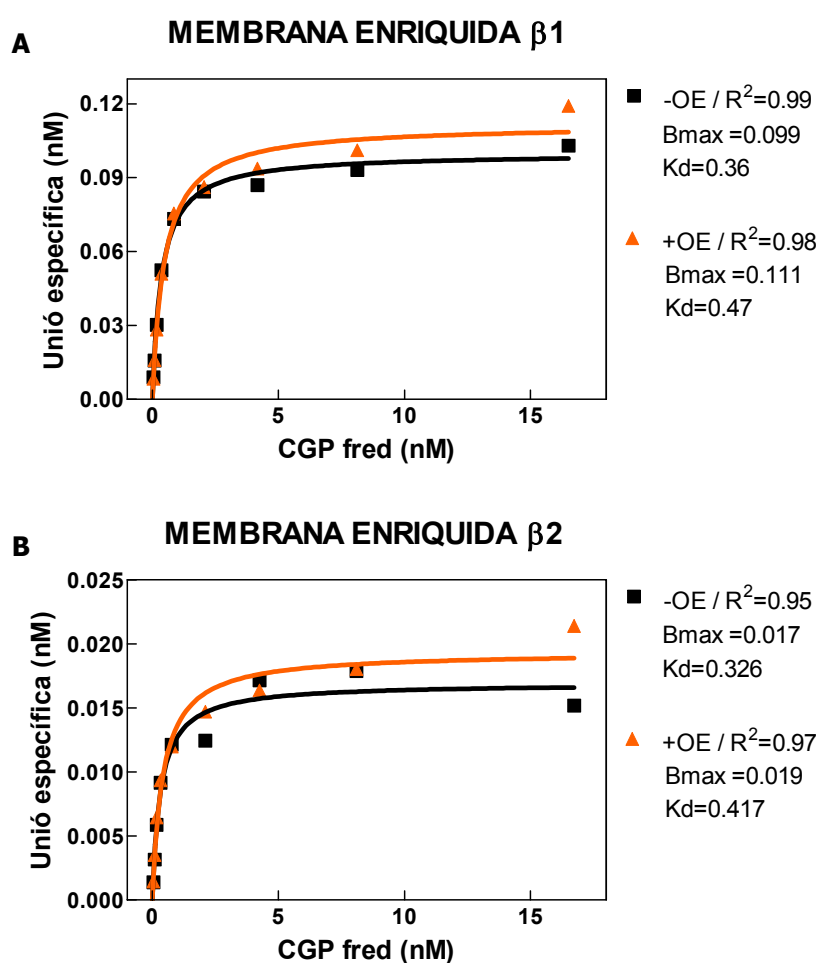


Figura 4. Gràfics de l'estudi de binding de CGP-12177 amb membranes enriquides en receptors  $\beta 1$  (A) o  $\beta 2$  (B) en presència o absència d'OE. Les dades cinètiques de la corba d'unió representen la unió màxima (Bmax) i la constant de dissociació (Kd). També es mostra el coeficient de correlació (R2)

D'altra banda ens quedava l'opció que l'OE, tot i no unir-se als receptors  $\beta$  per si mateix, fos capaç d'afavorir la unió dels seus agonistes. Per això es va estudiar la cinètica



d'unió de l'antagonista CGP-12177 a membranes de cèl·lules provinents de liposuccions enriquides en receptors  $\beta_1/\beta_2$  mitjançant papilovirus. En tots dos casos, la cinètica d'unió de l'antagonista es no es va modificar significativament per la presència d'OE (figura 4), per tant no sembla que l'OE interaccioni en la unió lligand-receptor dels receptors  $\beta_1$  i  $\beta_2$ .

### b) Possible mecanisme d'acció: receptors nuclears esteroideus

Per estudiar la captació de l'OE en la cèl·lula adiposa es van utilitzar novament el model cel·lular 3T3-L1. Es va utilitzar  $^3\text{H}$ -OE marcat radioactivament a l'estrona per poder seguir més fàcilment l'hormona. En aquest cas també es van provar diferents medis d'incubació degut al problema d'insolubilitat de l'OE en medis aquosos, que són els habituals en les incubacions de cèl·lules.

Es van fer les incubacions a diferents temps, fins a 48 hores, amb una concentració d'OE al medi d'1  $\mu\text{M}$  (i activitat específica de 370 Bq/ml). En el medi hi havia un 1% d'etanol (en què es dissolia l'OE) i una proporció d'1% o 10% de sèrum de fetus boví (FBS). En aquestes condicions es van obtenir les cinètiques següents:

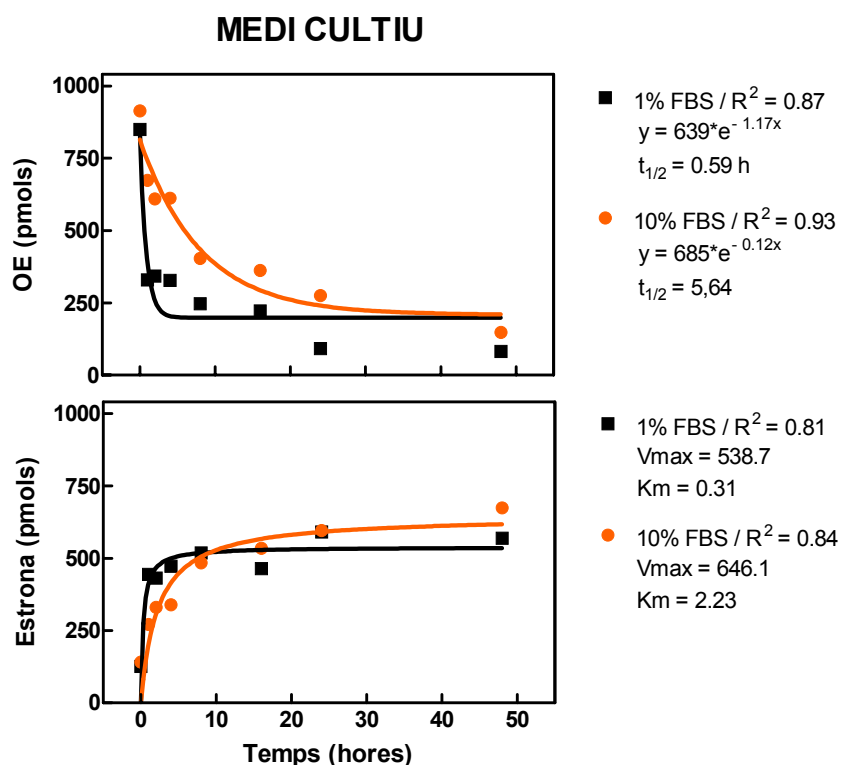


Figura 3. Nivells d'estrona i OE en el medi de cultiu cel·lular de 3T3-L1 després d'una incubació a diferents temps amb OE 1  $\mu\text{M}$ . Els valors representen la mitjana de 2-3 experiments. També es mostren les equacions a les que s'ajusten les corbes de desaparició (OE) i les constants d'aparició (estrona) juntament amb la vida mitja de l'OE en el medi de cultiu calculat de les dades representades en la gràfica i els seus coeficients de correlació ( $R^2$ ).

Com es pot veure a la figura 3, tant en presència de concentracions 1% com 10% de FBS, hi ha una ràpida desaparició de l'OE i una ràpida aparició de l'estrone lliure (E) al medi. Aquest fet l'interpretem com la conseqüència d'una activitat enzimàtica (esterasa). Si això es cert, hauríem de detectar una entrada ràpida de l'estrone dins de les cèl·lules, així com es mostra en la Figura 4.

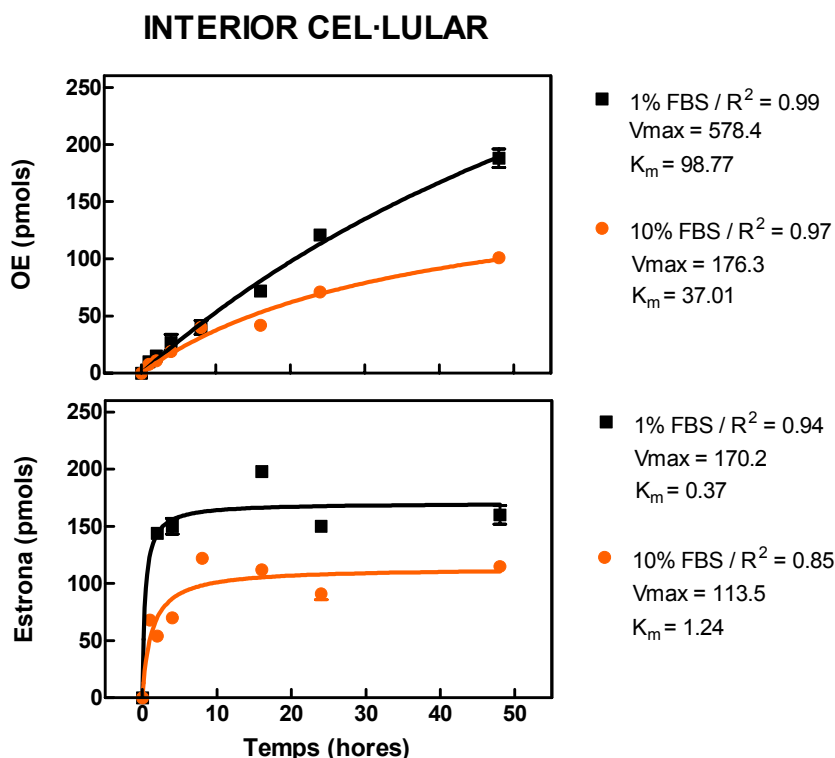


Figura 4. Nivells d'estrone i OE en l'interior cel·lular 3T3-L1 després d'una incubació a diferents temps amb OE 1  $\mu$ M. Els valors representen la mitjana de 2-3 experiments. També es mostren les constants de les corbes d'aparició (OE i estrone) a les que s'ajusten les dades representades en la gràfica i els seus coeficients de correlació ( $R^2$ ).

Com a conseqüència esperada, també podem veure en la figura 4 com una part de l'estrone captada per la cèl·lula és utilitzada per resintetitzar OE. El fet que la velocitat de captació d'estrone sigui més gran que la síntesi d'OE, implica la possible participació d'aquest compost en altres activitats o una limitació en la seva taxa de síntesi. L'entrada d'OE a la cèl·lula sembla ser nula o amb una velocitat molt baixa, donat que la pendent de l'aparició d'OE a l'interior cel·lular és del mateix ordre a l'observat en experiments de síntesi d'OE a partir d'estrone (Esteve i col, 1999).

Un possible model dinàmic relatiu a l'entrada/sortida d'OE de la cèl·lula es mostra a la figura 5.

$$\begin{aligned} \text{DESAPARICIÓ D'OE AL MEDI} &= k_1 \cdot \text{OE} - k_2 \cdot \text{E} - k_8 \text{OE}_i + k_7 \text{OE} \\ \text{APARICIÓ D'E AL MEDI} &= k_1 \cdot \text{OE} - k_2 \cdot \text{E} + k_4 \text{E}_i - k_3 \text{E} \\ \text{APARICIÓ D'E A LA CÈL·LULA} &= k_6 \cdot \text{OE}_i - k_5 \cdot \text{E}_i - k_4 \text{E}_i + k_3 \text{E} \\ \text{APARICIÓ D'OE A LA CÈL·LULA} &= -k_6 \cdot \text{OE}_i + k_5 \cdot \text{E}_i - k_8 \text{OE}_i + k_7 \text{OE} \end{aligned}$$

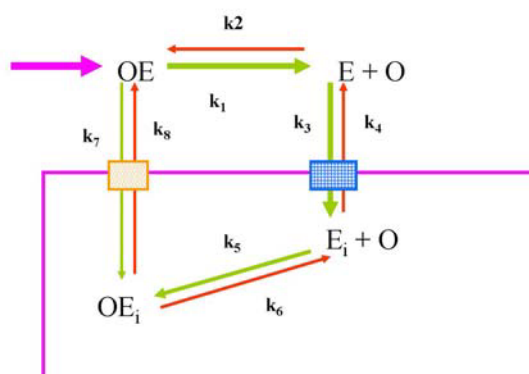


Figura 5. Model proposat de dinàmica d'entrada, sortida i transformació (esterificació i hidròlisi) d'estrone i OE a través de la membrana plasmàtica de cèl·lules 3T3-L1 en cultiu. Cadascun dels enzims o sistemes de transport implicats estan representats per un factor  $k$  que multiplicats per la concentració de les hormones donaran lloc a una sèrie d'equacions d'aparició o desaparició de cada hormona en cada compartiment (cèl·lula/medi). E=estrone,  $E_i$ =estrone intracel·lular,  $OE_i$  = OE intracel·lular.

Les dades obtingudes fins ara ens suggereixen que en aquest model els factors  $k_2$  i  $k_7$  són mínims, mentre que  $k_1$ ,  $k_3$  i  $k_5$  semblen ser determinants per l'equilibri. Així, podríem dir que la velocitat de captació cel·lular seria determinada per les constants  $k_1$  i  $k_3$  (si assumim que un cop dins la cèl·lula, l' $E_i$  no torna a sortir al medi, i que per tant  $k_4$  és 0).

El que calia fer a continuació era comprovar que aquesta cinètica de captació fos repetible en d'altres circumstàncies, doncs hem de pensar que l'etanol com a vehicle per incorporar l'OE al sistema de cultiu no és el més adient. Això és degut a que en condicions aquoses del medi de cultiu, és esperable que l'OE (insoluble per ell sol en medi aquós) que arriba al medi en dissolució en etanol perdi la solubilitat i no es trobi en les condicions adequades per interaccionar amb el sistema de reconeixement/transport de la cèl·lula (receptor i/o transportador), unes condicions que d'altra banda, sens dubte, estan força allunyades de les que es donen *in vivo*, doncs no oblidem que l'OE és un producte natural, sintetitzat i emmagatzemat en el teixit adipós (Esteve i col, 1999).

Amb aquesta finalitat es van dur a terme les següents variacions:

En la Figura 6 es mostra la resposta quan s'utilitza com a vehicle una emulsió (Intralipid©) que conté OE internalitzat en liposomes o bé HDL carregades artificialment

amb OE, i es compara les dades obtingudes amb la solució d'OE en etanol. En el cas de les incubacions amb OE dissolt en etanol s'ha utilitzat una mínima concentració d'FBS (1%) per evitar que la precipitació de l'OE i l'adhesió d'aquest al plàstic, mentre que en les preparacions amb Intralipid (IL) o HDL això no es va considerar necessari per la seva característica solubilitzadora de molècules de caràcter lipòfil. Podem observar una gran diferència de comportament entre les incubacions en absència o presència d'un 10% d'FBS tal i com passava amb l'etanol (quan s'augmentava el % de FBS). En tots el casos però, la vida mitja de l'OE és força superior en incorporar-lo en liposomes en comparació a les HDL o l'etanol. La presència d'FBS comporta clarament un increment de la vida mitja de l'OE al medi que arriba a incrementar-se en 10 vegades (en el cas de l'etanol).

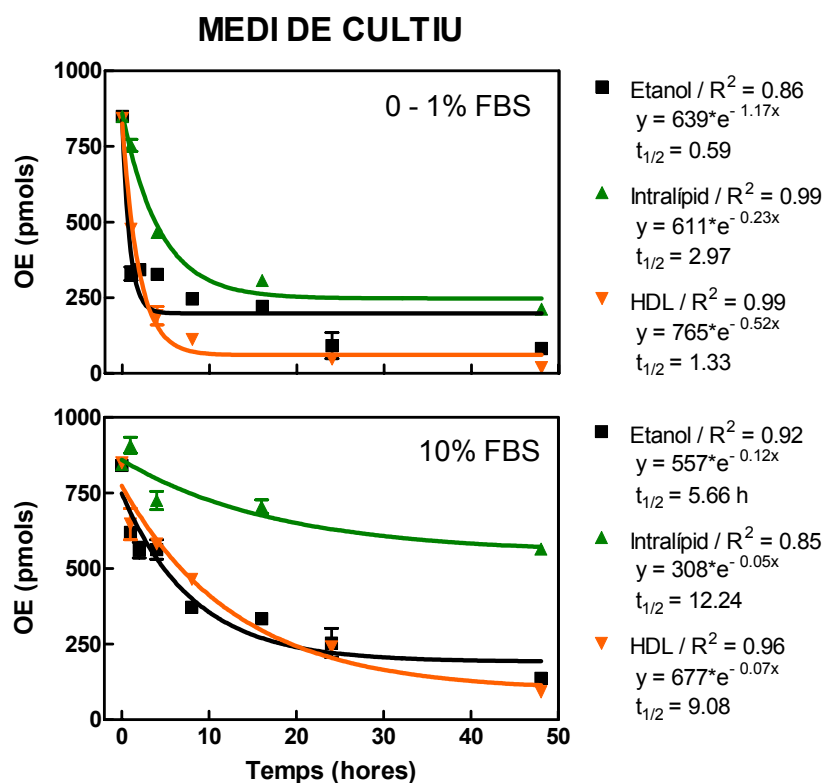


Figura 6. Nivells d'OE en el medi de cultiu de 3T3-L1 després d'una incubació a diferents temps amb OE 1 $\mu$ M administrat en diferents formes (dissolt en etanol (etanol), introduït en liposomes (intralipid) o carregat en partícules d'HDL de rata (HDL)). Els valors representen la mitjana de 3 experiments. La primera gràfica representa els resultats en realitzar les incubacions en absència (intralipid/HDL) o només un 1% d'FBS (etanol) mentre que la segona recull les dades en incrementar l'FBS al 10%. També es mostren la vida mitja i l'equació a la que s'ajusten les corbes de desaparició d'OE al medi calculades de les dades representades en la gràfica i els seus coeficients de correlació ( $R^2$ ).

Aquests fets repercuteixen, evidentment, en la cinètica de resíntesi cel·lular d'OE, degut a la limitació de substrat. Cal destacar els nivells d'OE que es van assolir en la incubació amb IL i sense FBS, donat que en aquestes condicions els nivells d'OE intracel·lulars es van mantenir sempre per sobre dels nivells d'E (figura 7). D'altra banda, la presència del 10% d'FBS redueix els nivells intracel·lulars de l'hormona, de manera que els nivells d'E són dels mateix ordre o superiors en tota la durada de l'experiment.

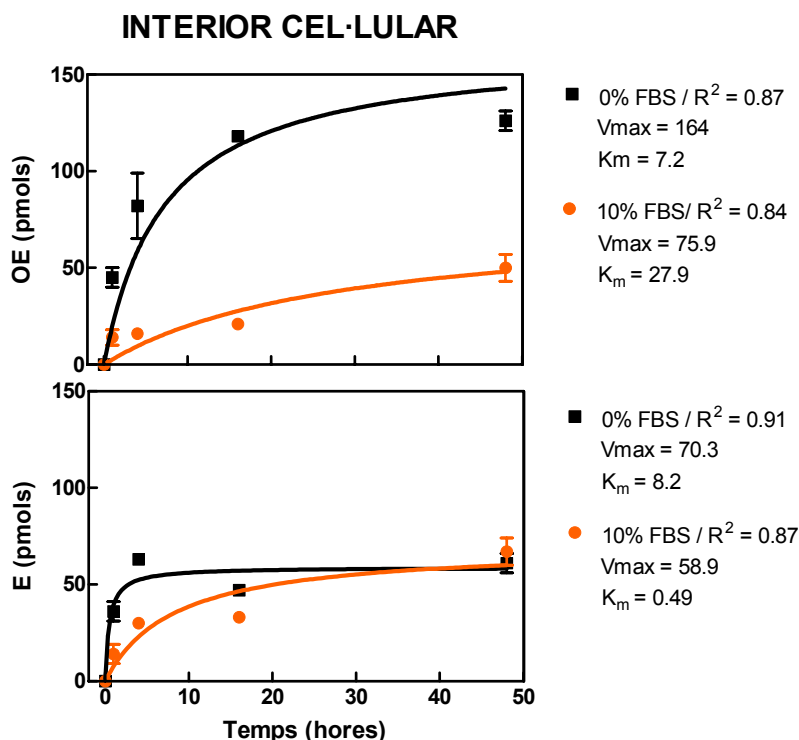


Figura 7. Nivells d'estrone i OE en l'interior cel·lular de 3T3-L1 després d'una incubació a diferents temps amb OE  $1\mu\text{M}$  en intralípid. Els valors representen la mitjana de 3 experiments. També es mostren les equacions a les que s'ajusten les corbes d'aparició (OE i estrone) calculades de les dades representades en la gràfica. També es mostren les constants de les corbes d'aparició (OE i estrone) a les que s'ajusten les dades representades en la gràfica i els seus coeficients de correlació ( $R^2$ ).

Com a comprovació per saber si aquests efectes sobre l'estabilitat de la molècula d'OE eren deguts a un enzim amb activitat esteràsica, es van realitzar incubacions en presència d'un inhibidor d'esterases (no específic): Fluorur de fenil-metil-sulfonil (PMSF), malgrat que aquest també inhibeix activitats proteàsiques. Les condicions d'incubació en aquest cas van ser les mateixes que en els experiments amb OE en etanol, donat que eren les condicions en que més s'apreciava l'efecte de la hidròlisi d'OE. Les dades cinètiques (figura 8) mostraven una activitat molt més lenta, que a la llarga acabava desapareixent, tal i com ens indica la

seva  $t_{1/2}$ , en les dos concentracions FBS assajades. També en aquest cas la presència de sèrum al medi d'incubació augmentava la vida mitja de l'OE.

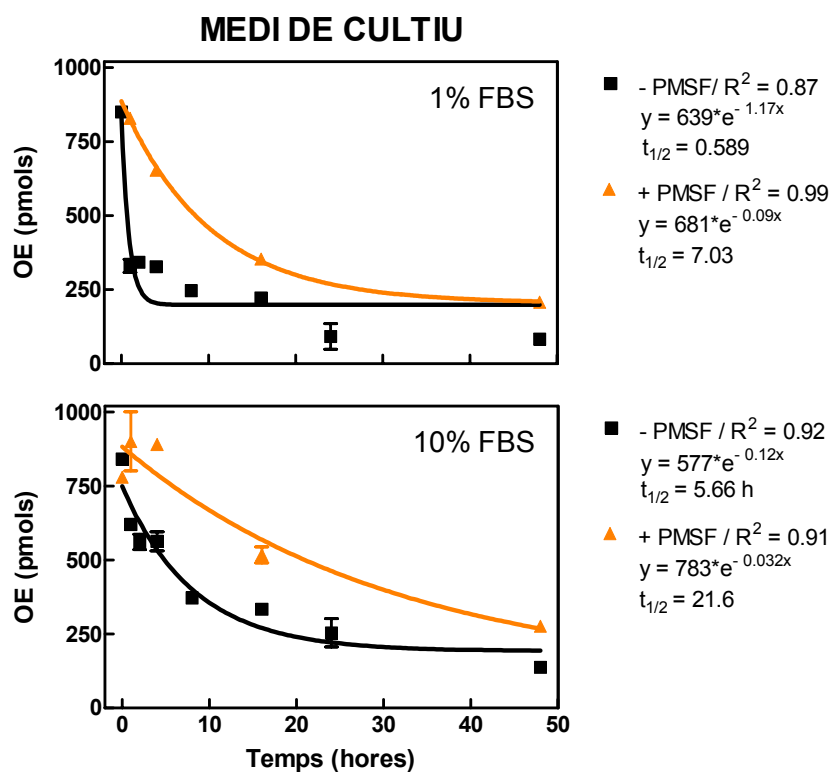
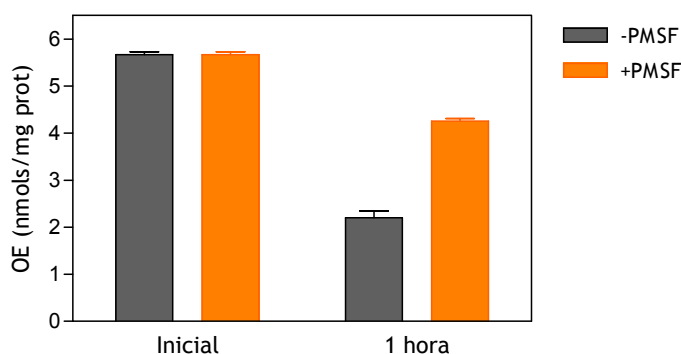


Figura 8. Nivells d'OE en el medi de cultiu de 3T3-L1 després d'una incubació a diferents temps amb OE  $1\mu\text{M}$  en presència o absència de PMSF. Els valors representen la mitjana de 3 experiments. També es mostren la vida mitja i l'equació a la que s'ajusten les corbes de desaparició d'OE calculades de les dades representades en la gràfica i els seus coeficients de correlació ( $R^2$ ).

Cal destacar que la vida mitja del PMSF és curta, al voltant de 3 hores, i per tant es van analitzar les dades que s'obtenien en les primeres hores de la incubació (figura 9). El trencament resulta ser molt menor quan hi ha PMSF al medi que quan aquest no hi és, on al cap d'una hora s'ha trencat més d'un 50% de l'OE inicial.

Figura 9. Nivells d'OE en el medi de cultiu de 3T3-L1 abans i després d'una incubació d'una hora amb OE  $1\mu\text{M}$  en presència o absència de PMSF. Els nivells d'OE estan expressats en nmols extrapolats del marcatge radioactiu corregit per l'activitat específica i per unitat de proteïna cel·lular. Els valors representen la mitjana de 3 experiments.



Finalment es van fer incubacions amb aquelles hormones que s'havia descrit que regulaven el procés de síntesi d'OE en aquest tipus cel·lular. Així es van fer incubacions en presència de corticosterona, insulina i leptina amb OE en etanol per observar com afectaven aquestes hormones l'activitat esterasa o l'entrada a la cèl·lula (figura 10).

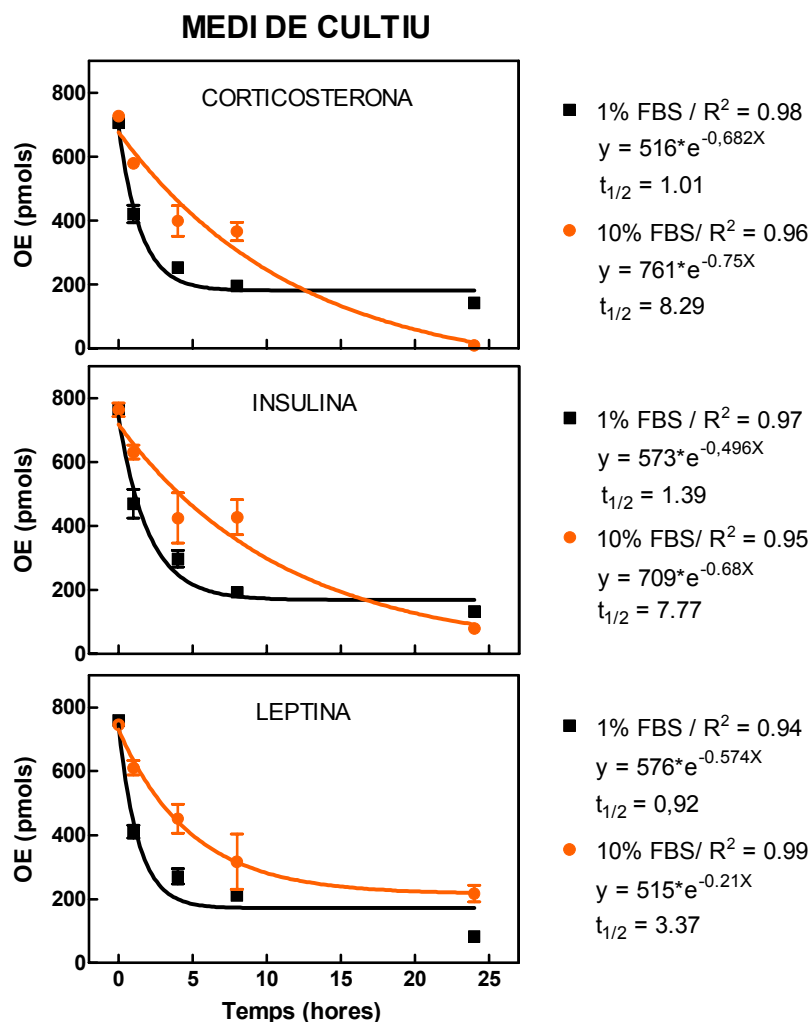


Figura 10. Nivells d'OE en el medi de cultiu de 3T3-L1 en presència de corticosterona (superior), insulina (mig) i leptina (inferior). Els valors representen la mitjana de 3 experiments. També es mostren la vida mitja i l'equació a la que s'ajusten les corbes de desaparició d'OE calculades de les dades representades en la gràfica i els seus coeficients de correlació ( $R^2$ ).

Comparant cadascuna de les hormones assajades amb el seu control podríem dir que no tenen cap efecte a nivell de l'activitat esterasa que estem estudiant, doncs si es comparen estadísticament els valors de les constants de les equacions de decaïment no es poden considerar diferents, tot i que els temps de vida mitja siguin lleument diferents. Els valors dels nivells d'E i OE a l'interior cel·lular van ser també similars als obtinguts en els

seus control, i per tant no actuen tampoc limitant la velocitat de captació de cap de les dues hormones.

Un cop aclarida la presència d'una activitat esterasa es va intentar caracteritzar aquesta activitat en diferents fraccions cel·lulars, tot i que les dades que teníem fins el moment ens indicaven una activitat principal en membrana plasmàtica. Així es van obtenir fraccions subcel·lulars d'adipòcits 3T3-L1: citosol, membrana plasmàtica (MP), microsomes d'alta densitat (HDM), microsomes de baixa densitat (LDM) i mitocondris/nuclis (MN). Les incubacions es van realitzar a tres pHs diferents per tal d'abarcara els diversos pHs que es poden trobar dins la cèl·lula en condicions fisiològiques normals (figura 11).

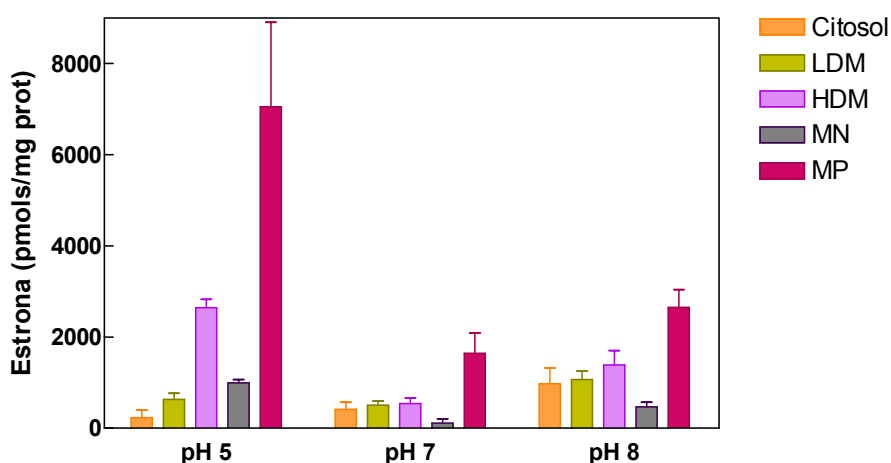


Figura 11. Nivells d'E en cadascuna de les fraccions subcel·lulars estudiades després d'una hora d'incubació amb OE a pH 5, 7 i 8. Els nivells d'E estan expressats en pmols extrapolats del marcatge radioactiu corregit per l'activitat específica i per la quantitat de proteïna de cada fracció utilitzada. Els valors representen la mitjana de 3 experiments. MN=mitocòndria, LDM=microsomes de baixa densitat, HDM=microsomes d'alta densitat, MP=membrana plasmàtica.

Les dades varien força en funció del pH del medi. Així a pH 5 hi ha una forta activitat en membrana plasmàtica i en la fracció corresponent a l'aparell de Golgi i lisosomes (HDM). A pH fisiològic (pH 7) les dades d'activitat més altes s'obtenen també en membrana plasmàtica igual com es pot observar a pH 8.



## DISCUSSIÓ

La ràpida desaparició de l'OE coincident amb una ràpida aparició d'estrone del medi de cultiu ens va fer pensar ràpidament amb una presència d'activitat esterasa en la cèl·lula adiposa 3T3-L1, probablement associada a la membrana plasmàtica; doncs cal dir que la incubació de l'hormona en el medi de cultiu i sense presència cel·lular no afectava l'estabilitat de l'OE en cap cas (dades no mostrades). Dins la cèl·lula apareix més ràpidament l'estrone, tot i que van incrementant també els nivells d'OE més paulatinament. Donat que els nivells d'OE es corresponen amb els observats en experiments de síntesi d'OE, podem pensar que en aquestes condicions només travessa la membrana plasmàtica l'estrone. Com a conseqüència, la cèl·lula anirà sintetitzant OE a partir del seu substrat. Els experiments realitzats a nivell de sortida d'OE al medi s'ha observat com aquesta només és capaç de ser alliberada en presència de certes proteïnes. Aquestes mateixes proteïnes podrien ser necessàries per tal de transportar-se a l'interior cel·lular, i així podrien funcionar com a proteïnes transportadores en plasma.

El sèrum fetal d'origen boví (FBS) s'utilitza habitualment per cultivar les cèl·lules 3T3-L1, a una concentració del 10% en el medi. Es tracta d'un sèrum molt ric en proteïnes sèriques que ha estat sotmès a una inactivació del sistema del complement per tal d'evitar una reactivitat amb les cèl·lules cultivades. En cadascun dels experiments realitzats amb FBS s'ha observat un augment de la vida mitja de l'OE, el que ens fa pensar que d'alguna manera intervé en la acció de l'esterasa. Tot i això tampoc es veu una major entrada d'OE a la cèl·lula, sinó que més aviat al contrari, el que es troba són nivells inferiors d'OE intracel·lulars, doncs continua entrant l'estrone producte del trencament.

L'oleat d'estrone incorporada en liposomes administrada en rates per via intravenosa és una forma efectiva d'administrar d'oleat d'estrone que fa disminuir el pes corporal (Sanchis i col, 1996; Balada i col, 1997). Els liposomes s'utilitzen en aquest cas per mimetitzar una lipoproteïna que serveix de transport de l'OE. Això és exactament el que ens interessava simular també en el medi de cultiu: l'oleat d'estrone viatja pel medi incorporat en liposomes i arriba a la cèl·lula tal i com presumiblement hi arribaria *in vivo*. Els resultats de les incubacions de 3T3-L1 amb liposomes carregats d'oleat d'estrone segueixen un comportament realment molt diferent al que s'observava amb l'etanol. Els liposomes semblen ser una forma de transport més accessible per la cèl·lula, donat que els nivells d'OE intracel·lulars incrementen molt ràpidament en el temps, assolint uns nivells inicials d'OE superiors als altres casos estudiats, obrint la possibilitat que en aquest cas l'OE pugui travessar la membrana plasmàtica per ell mateix amb l'ajut de la presència de l'intralípid. El fet que marca la diferència respecte la incubació amb el altres vehicles és la ràpida saturació dels nivells d'OE que no es corresponen amb els baixos nivells d'E que entren a la cèl·lula.

Tanmateix, l'activitat esterasa extracel·lular es veu frenada d'alguna manera per la forma liposòmica, potser mantenint l'OE de manera menys accessible a l'enzim. Tot i que no sabem com interactua la partícula liposòmica amb la superfície cel·lular sembla que en aquest cas l'OE aconsegueix arribar a l'interior cel·lular més ràpidament. En aquest cas la presència d'una alta concentració de sèrum al medi dificulta l'arribada de l'OE a l'interior cel·lular. No es pot descartar que les proteïnes que conté el sèrum retinguin l'OE unit específicament/inespecíficament evitant el reconeixement amb el seu sistema de transport a la membrana.

Així doncs sembla que seria possible l'existència d'un sistema de transport d'OE extracel·lular que mantingués la molècula protegida de l'activitat esterasa extracel·lular de l'adipòcit que alhora fos capaç d'interactuar amb la membrana plasmàtica per tal de transferir l'OE a l'interior cel·lular i potser així interaccionar amb els mecanismes intracel·lulars responsables dels efectes de l'OE en teixit adipós.

Donat que la fracció del plasma corresponent a les HDL conté el transportador fisiològic de l'oleat d'estrona (Esteve i col, 2001a), seria presumiblement el millor vehicle perquè aquest arribi a la cèl·lula. Sorprenentment, els resultats no són millors que els que teníem en tenir l'oleat d'estrona en etanol. El més probable és que la metodologia utilitzada per obtenir la fracció d'HDL carregada artificialment d'oleat d'estrona radioactiu no resultés igual a la que es dona *in vivo*, i que per tant l'oleat d'estrona no es carregués de la forma adient. Potser el més correcte hauria estat en aquest cas obtenir una fracció d'HDL de plasma d'una rata a la que se li hagués administrat una dosi oral d'oleat d'estrona radioactiva, però la quantitat de radioactivitat necessària per dur a terme l'experiment és massa elevada com per aconseguir-la amb aquesta metodologia.

El PMSF és un compost organofosforat que actua com a inhibidor de proteases i d'algunes esterases. Aquesta molècula consta d'un grup sulfonil que reacciona amb grups serina de l'enzim i com a resultat es forma una sulfonilació que fa l'enzim inactiu. En els resultats de les incubacions de les cèl·lules amb oleat d'estrona en etanol amb presència de PMSF l'activitat esterasa es troba molt disminuïda en els primers temps, però és important tenir present que el PMSF és una molècula molt inestable en un medi aquós, i que en aquestes circumstàncies la seva vida mitja és d'unes 3 hores. D'altra banda la inhibició no és total al cap d'una hora d'incubació, no descartant així el fet que l'OE sigui susceptible de ser atacada per més d'un tipus enzimàtic. Per tant aquest resultat ens fa pensar que com a mínim, una part de l'activitat esterasa que es troba en aquest tipus cel·lular, consta de grups serina necessaris per la catàlisi, i que per tant, segons la definició d'Aldridge correspon a una esterasa de tipus B o també anomenades carboxilesterases (Aldridge WN, 1953).

La insulina redueix la captació d'estronea total a la cèl·lula, i la leptina i la corticosterona incrementen la síntesi d'oleat d'estronea a l'adipòcit (Esteve i col, 2001b). Els resultats obtinguts pel que fa a la interferència d'aquestes hormones a l'activitat esterasa no mostren diferències significatives en cap dels casos. Podríem dir doncs, que l'activitat esterasa observada en aquest tipus cel·lular no està regulada a nivell de les hormones assajades.

Tal i com indicaven les dades de les incubacions del sistema cel·lular estudiat, el fraccionament subcel·lular ens mostra una activitat hidrolítica sobre l'OE força activa i localitzada a la membrana plasmàtica. Això es pot observar en tots els pHs estudiats, tot i que també s'observa activitat esterasa a d'interior cel·lular en la fracció corresponent als lisosomes i aparell de Golgi.

Aquestes dades confirmen sens dubte, que l'activitat esterasa de la membrana plasmàtica pot jugar un paper clau en la disponibilitat cel·lular de l'OE. Malgrat tot, aquesta disponibilitat implica un procediment molt costós, doncs es produeix un trencament extracel·lular, el pas de l'estronea (i de manera paral·lela de l'àcid gras) a través de la membrana i la resíntesi a l'interior cel·lular, que alhora implica la presència d'una activitat sintetasa, probablement amb la despesa d'energia a partir d'un ATP que hi és associada.

Les dades obtingudes en els experiments de lipòlisi van canviar de significat un cop descoberta la forta activitat esterasa de la que les cèl·lules disposaven, així calia replantejar-se els resultats i interpretar-los novament:

La forma de presentació de l'OE a la cèl·lula potser no és la més escaient, així gran part de la que se li administra acaba en forma d'estronea que podria dur a terme efectes que contrarestarien els efectes de l'OE. Per tant no podem estar segurs que els nivells de glicerol/AMPC observats siguin la resposta a la dosi administrada d'OE.

La utilització d'un sistema *in vitro* ens allunya del que realment pot estar passant *in vivo*, malgrat la utilització dels controls corresponents. Des del moment que el sistema no es troba en el mateix context fisiològic que la cèl·lula adiposa dins el seu teixit, sempre poden mancar o interferir alguns dels factors claus que són necessaris perquè l'OE dugui a terme la seva funció.

Les cèl·lules 3T3L-1 són cèl·lules diferenciades dels fibroblasts i no són realment cèl·lules adiposes, malgrat que presentin molts dels trets característics de les cèl·lules adiposes.

Totes aquestes raons, més el fet que l'activitat esterasa sigui gairebé universal i el fet conegut de l'extrema hidrofobicitat de l'OE, dibuixen prou ombres com per a que no puguem tenir la certesa absoluta de no estar introduint artefactes experimentals. A més a més,

sabem que l'OE viatja en sang formant part de diferents fraccions de lipoproteïnes (Virgili i col, 1999; Esteve i col, 2001a), per la qual cosa, potser sigui formant part d'aquests compostos la forma en que fisiològicament es presenta davant les cèl·lules.

Malgrat tot, incubacions en presència de PMSF tampoc no incrementaven els valors de glicerol/AMPC alliberat al medi, tot i que cal tenir en compte que aquest compost pot actuar a altres nivells, inhibint també d'altres activitats enzimàtiques que puguin alterar el sistema de cultiu. A més, els estudis de binding realitats amb membranes d'eritròcits, adipòcits i amb receptors  $\beta 1$  i  $\beta 2$  no demostren en cap cas que l'OE s'hi uneixi ni que tant sols afavoreixi la unió dels seus agonistes/antagonistes.

Per totes aquestes raons vam decidir no continuar per aquest camí, essencialment fins tenir un model més fisiològic de presentació de l'OE. Vam decidir buscar alternatives que ens permetin aproximar-nos al mecanisme d'acció de l'OE, a través d'estudis a curt termini i de l'expressió de gens i la possible implicació en les vies de mort cel·lular (apoptosi).

## REFERÈNCIES

Aldridge WN. Serum esterases 1. Two types of esterases (A and B) hydrolyzing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate and a method for their determination. *Biochem J* 1953; 53: 110-117.

Balada F, Sanchis D, Grasa MM, Virgili J, Estruch J, Fernandez-Lopez JA, Remesar X, Alemany M. Effect of the slimming agent oleoyl-estrone in liposomes on the body weight of Zucker obese rats. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1997 Sep;21(9):789-95.

Cabot C, del Mar Grasa M, Fernandez-Lopez JA, Alemany M. Effect of oleoyl-estrone treatment on the expression of beta1- beta2- and beta3-adrenoreceptors in rat adipose tissues. *Mol Cell Biochem*. 2001 May;221(1-2):109-15.

Cabot C, Salas A, Ferrer-Lorente R, Savall P, Remesar X, Fernandez-Lopez JA, Esteve M, Alemany M. Short-term oral oleoyl-estrone treatment increases plasma cholesterol turnover in the rat. *Int J Obes (Lond)*. 2005 May;29(5):534-9.

Esteve M, Savall P, Blay MT, Fernandez-Lopez JA, Remesar X, Alemany M. Intestinal handling of an oral oleoyl-estrone gavage by the rat. *Life Sci*. 2001a Jul 6;69(7):763-77.

Esteve M, Savall P, Virgili J, Fernandez-Lopez JA, Remesar X, Alemany M. Modulation by leptin, insulin and corticosterone of oleoyl-estrone synthesis in cultured 3T3 L1 cells. *Biosci Rep*. 2001b Dec;21(6):755-63.

Esteve M, Virgili J, Aguilar H, Balada F, Fernandez-Lopez JA, Remesar X, Alemany M. Leptin enhances the synthesis of oleoyl-estrone from estrone in white adipose tissue. *Eur J Nutr.* 1999 Apr;38(2):99-104.

Grasa MM, Vila R, Esteve M, Cabot C, Fernandez-Lopez JA, Remesar X, Alemany M. Oleoyl-estrone lowers the body weight of both ob/ob and db/db mice. *Horm Metab Res.* 2000 Jun;32(6):246-50.

Hong SJ, Fong JC, Hwang JH. Effects of crude drugs on lipolysis in differentiated 3T3-L1 adipocytes. *Kaohsiung J Med Sci* 2002 Apr;18(4):157-63

Sanchis D, Balada F, del Mar Grasa M, Virgili J, Peinado J, Monserrat C, Fernandez-Lopez JA, Remesar X, Alemany M. Oleoyl-estrone induces the loss of body fat in rats. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 1996 Jun;20(6):588-94.

Virgili J, Casals I, Peinado-Onsurbe J, Esteve M, Julve-Gil J, Fernandez-Lopez JA, Remesar X, Alemany M. Distribution of oleoyl-estrone in rat plasma lipoproteins. *Horm Metab Res.* 1999 Nov;31(11):597-601.



## **BLOC II**

---

### **EFFECTES DEL TRACTAMENT AMB OLEAT D'ESTRONA "IN VIVO"**





## ***1. Les Rates Tractades amb Oleat d'Estrona Mantenen l'Homeòstasi Glucídica: Comparació amb un Model Pair-Fed***

---

A. Salas, M. Esteve, MM. Grasa and X. Remesar. Rats treated with oleoyl-estrone maintain glucidic homeostasis: comparisons with a pair-fed model. *British Journal of Nutrition* (2005), 94, 1-9.



## INTRODUCCIÓ

L'oleat d'estrone (OE) es sintetitza a partir d'estrone en les cèl·lules adiposes (Esteve i col, 2001) i s'allibera a la circulació sanguínea, on les seves concentracions correlacionen amb la massa de greix corporal (Fernández-Real i col, 1999; Cabot i col, 2000). Donat que la seva administració experimental provoca una reducció del greix corporal, sense la corresponent pèrdua de proteïna corporal (Sanchis i col, 1996; Grasa i col, 2001), l'OE s'ha postulat com una senyal lipostàtica reguladora de la massa grassa corporal. L'administració intravenosa de dosis farmacològiques d'OE causen lleugers efectes estrogènics, i comporten alts nivells circulants d'estrone (Cabot i col, 2001). L'administració oral de l'ester d'estrone, en canvi, no fa possible aquests efectes mantenint uns nivells baixos en plasma tant d'estrone com d'estradiol (Cabot i col, 2001). La disminució de la ingesta induïda per l'OE és força acusada en els primers 2 dies del tractament, però ràpidament es recupera; fet que contrasta amb el patró observat amb el pes corporal, que manté la diferència en relació amb els controls força temps després d'aturar el tractament (Adán i col, 1999).

Tot i que el mecanisme d'acció de l'OE continua desconegut, les dades semblen indicar que hi ha implicades vies diferents de les activades pel dejuni. Així, la restricció d'aliment induïx una reducció del pes corporal, resultat d'un marcat increment en la mobilització lipídica (Comizio i col, 1998) que contrasta amb el patró observat amb el dejuni a curt termini, amb una lipòlisi limitada i una ràpida utilització de les reserves de glicogen, induïnt una pèrdua dramàtica del pes del fetge (Palou i col, 1981). Aquest estudi es va dissenyar per tal d'establir si els efectes de l'OE en el metabolisme intermediari eren o no una simple conseqüència de la reducció de la ingesta. Per això es van comparar rates femelles tractades amb OE (grup OE) durant un període de 10 o 20 dies amb rates a les que es va alimentar amb la mateixa quantitat d'aliment consumit per les rates tractades (grup pair-fed, PF).

## RESULTATS

La ingesta del grup de rates tractades amb OE es va reduir marcadament durant els 4 primers dies (figura 1); però van recuperar els nivells dels controls al dia 10 de tractament. Els animals tractats van menjar una mitjana de  $163 \pm 8,4$  g en front dels  $196 \pm 7,11$  g consumits per les rates control. Les diferències d'ingesta entre els grup OE i PF respecte del grup control van ser significants només durant els 5 primers dies del tractament. Entre els dies 10 i 20, el grup control va consumir  $193 \pm 8,11$  g mentre els grups OE i PF van ingerir  $169 \pm 11,1$  g.

La figura 2 mostra els canvis en el pes corporal durant el període estudiat. El grup OE va mostrar un pes corporal significativament inferior que el grup PF durant el tractament. Així, hi ha una reducció inicial en el pes corporal tant en el grup OE com PF, assolint amb una valors mínims a dia 4, seguit d'una recuperació parcial paral·lela amb el grup control; tot i això, la diferència es mantingué fins al final de l'estudi. S'ha de destacar però, que la recuperació del grup PF va tendir a ser més ràpida que la del grup OE.

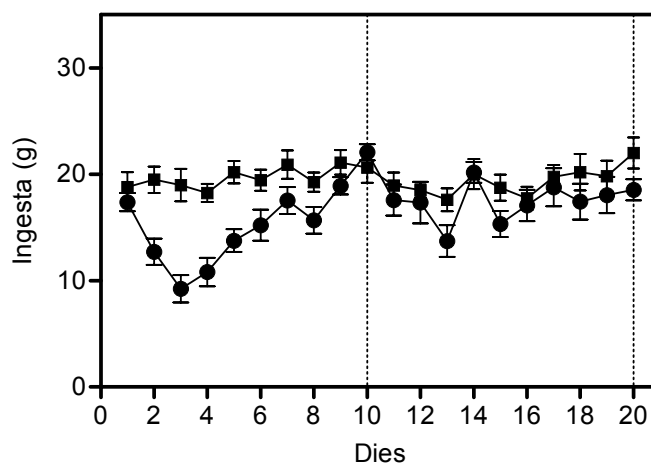


Figura 1. Canvis en la ingesta de rates femelles Wistar després de 10 o 20 dies de rebre dosis diàries d'oli (grup control, ■) o  $10\mu\text{mol/kg}$  d'oleat d'estronea (OE)/ grup pair-fed (PF) (●). Les rates PF es van alimentar amb la mateixa quantitat de pinso que el grup OE. Els valors d'aquesta figura són les mitjanes (de 6 a 12 animals diferents) amb els seus errors estàndard representats per barres verticals. Les diferències significatives entre grups (ANOVA de 2 factors): efecte del temps  $P < 0.0001$ ; efecte del tractament  $P < 0.0001$ . Post-test de Bonferroni: els valors de control i OE van ser diferents en els dies 2 i 5 ( $P < 0.05$ ) així com els dies 3 i 4 ( $P < 0.001$ ). No hi havia diferències entre els grups OE i PF.

La taula 1 ens mostra que els valors de glucosa, NEFA, 3-hydroxybutirat i triacilglicerols no es van afectar per l'OE, tot i la durada del tractament. El grup control i OE només van presentar diferències en els nivells de colesterol total i colesterol HDL, resultant

particularment inferiors en el grup OE; en canvi, el grup PF va mostrar nivells significativament incrementats en els metabòlits lipídics de dia 10, tot i que no es mantingueren fins a dia 20, on només s'observava una reducció de la glucosa i la urea i un increment del 3-hidroxibutirat. Una comparació directa entre els grup OE i PF revela diferències significatives entre urea, triacilglicerols, NEFA, 3-hidroxibutirat, colesterol i colesterol HDL.

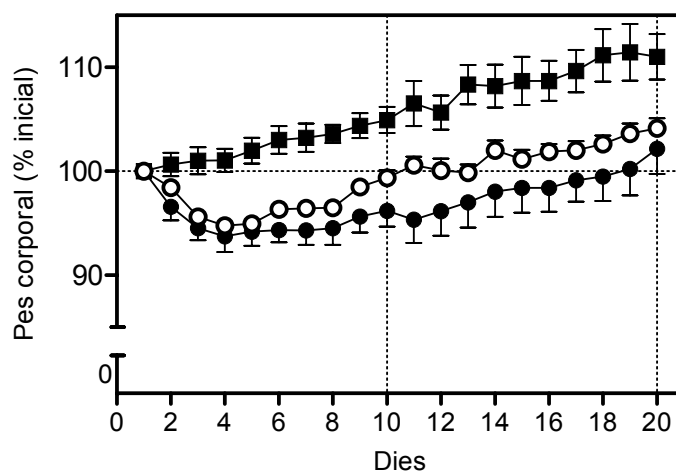


Figura 2. Canvis en el pes corporal de rates femelles Wistar després de 10 o 20 dies de rebre dosis diàries d'oli (grup control, ■) o 10 $\mu$ mol/kg d'oleat d'estronea (OE) (●) i grup pair-fed (PF) (○). Els valors d'aquesta figura són les mitjanes (de 6 a 12 animals diferents) amb els seus errors estàndard representats per barres verticals. Les diferències significatives entre grups (ANOVA de 2 factors): efecte del temps  $P < 0.0001$ ; efecte del tractament  $P < 0.0001$ . Post-test de Bonferroni: els valors de control i OE van ser diferents des del dia 3 de tractament ( $P < 0.05$ ). L'ANOVA de 2 factors restringida als grups OE i PF va mostrar diferències significatives tant pel temps ( $P < 0.0001$ ) com pel tractament ( $P < 0.0003$ , sense interaccions ( $P = 0.9056$ ) o diferències a cada punt quan s'aplica el test de Bonferroni.

Els nivells d'hormones en sèrum van experimentar diferències importants entre els grups tractats i controls, tal i com s'observa en la taula 2. A dia 10, les rates tractades amb OE mostraven nivells inferiors de leptina i insulina, i nivells superiors d'acil-estronea que els controls, que es mantenien intactes a dia 20 en el cas de la leptina. El grup PF tenia nivells més baixos de leptina i insulina i més alts d'adiponectina a dia 10 que el grup control. Les diferències de leptina i insulina es mantenien encara el dia 20. Una comparació directa entre OE i PF indica que els nivells d'insulina i adiponectina eren realment diferents.

Taula 1. Nivells de metabòlits plasmàtics de rates femelles Wistar després de 10 o 20 dies de tractament \*  
(Valors mitjos amb errors estandar de sis animals per grup)

Paràmetre	10 dies						20 dies						Pt
	Control		OE		PF		Control		OE		PF		
	Mitjana	SEM	Mitjana	SEM	Mitjana	SEM	Mitjana	SEM	Mitjana	SEM	Mitjana	SEM	
Glucosa (mM)	5.74 ± 0.08 <sup>A</sup>	5.55 ± 0.11 <sup>A</sup>	5.68 ± 0.13 <sup>A</sup>	6.17 ± 0.30 <sup>A</sup>	5.71 ± 0.10 <sup>A</sup>	5.29 ± 0.10 <sup>B</sup>	0.6221	0.0209	0.1291				
Urea (mM)	5.00 ± 0.38 <sup>A</sup>	5.50 ± 0.49 <sup>A</sup>	4.67 ± 0.26 <sup>A</sup>	5.99 ± 0.47 <sup>A</sup>	6.64 ± 0.27 <sup>A</sup>	4.93 ± 0.56 <sup>B</sup>	0.0282	0.0193	0.0067				
Triacilglicerols (mM)	0.40 ± 0.04 <sup>A</sup>	0.46 ± 0.03 <sup>A</sup>	0.73 ± 0.08 <sup>B</sup>	0.61 ± 0.09 <sup>A</sup>	0.46 ± 0.05 <sup>A</sup>	0.56 ± 0.06 <sup>A</sup>	0.8083	0.0180	0.0047				
Àcids grassos lliures (mM)	0.38 ± 0.05 <sup>A</sup>	0.43 ± 0.03 <sup>A</sup>	0.65 ± 0.01 <sup>B</sup>	0.49 ± 0.05 <sup>A</sup>	0.38 ± 0.02 <sup>A</sup>	0.50 ± 0.05 <sup>A</sup>	0.1856	0.0002	0.0002				
3-Hidroxitubirat (µM)	100 ± 9.01 <sup>A</sup>	104 ± 15 <sup>A</sup>	193 ± 17 <sup>B</sup>	82.1 ± 4.11 <sup>A</sup>	104 ± 10.1 <sup>A</sup>	175 ± 9.02 <sup>B</sup>	0.3566	<0.0001	0.0004				
Colesterol total (mM)	1.42 ± 0.11 <sup>A</sup>	0.69 ± 0.12 <sup>B</sup>	1.30 ± 0.08 <sup>A</sup>	1.21 ± 0.03 <sup>A</sup>	0.68 ± 0.11 <sup>B</sup>	1.19 ± 0.08 <sup>A</sup>	0.1638	<0.0001	<0.0001				
HDL-colesterol (mM)	1.29 ± 0.05 <sup>A</sup>	0.38 ± 0.06 <sup>B</sup>	1.18 ± 0.09 <sup>A</sup>	0.82 ± 0.05 <sup>A</sup>	0.48 ± 0.09 <sup>B</sup>	0.83 ± 0.07 <sup>A</sup>	0.0004	<0.0001	<0.0001				

OE, oleat d'estrona; PF, pair-fed.

<sup>A,B</sup>, Valors mitjos entre files amb diferents superíndexs són significativament diferents. (comparació *post hoc*, test de Bonferroni ; P<0.05)

† Significativitat de les diferències entre grups (ANOVA)

Taula 2. Valors d'hormones plasmàtiques de rates femelles Wistar després de 10 o 20 dies de tractament \*  
(Valors mitjos amb errors estandar de sis animals per grup)

Paràmetre	10 dies						20 dies						Pt
	Control		OE		PF		Control		OE		PF		
	Mitjana	SEM	Mitjana	SEM	Mitjana	SEM	Mitjana	SEM	Mitjana	SEM	Mitjana	SEM	
Glucosa (mM)	0.37 ± 0.06 <sup>A</sup>	0.24 ± 0.04 <sup>B</sup>	0.15 ± 0.01 <sup>B</sup>	0.55 ± 0.04 <sup>A</sup>	0.43 ± 0.03 <sup>B</sup>	0.25 ± 0.03 <sup>B</sup>	0.0002	0.0001	<0.0001				
Urea (mM)	0.16 ± 0.02 <sup>A</sup>	0.08 ± 0.01 <sup>B</sup>	0.09 ± 0.02 <sup>B</sup>	0.22 ± 0.02 <sup>A</sup>	0.11 ± 0.01 <sup>B</sup>	0.11 ± 0.02 <sup>B</sup>	0.0376	0.0001	0.6824				
Triacilglicerols (mM)	144 ± 12 <sup>A</sup>	109 ± 14 <sup>A</sup>	229 ± 28 <sup>B</sup>	182 ± 21 <sup>A</sup>	161 ± 14 <sup>A</sup>	193 ± 13 <sup>A</sup>	0.2184	0.0005	0.0004				
Àcids grassos lliures (mM)	147 ± 7.7 <sup>A</sup>	222 ± 17 <sup>B</sup>	181 ± 21 <sup>AB</sup>	206 ± 5.7 <sup>A</sup>	187 ± 21 <sup>A</sup>	196 ± 16 <sup>A</sup>	0.3176	0.183	0.3840				

OE, oleat d'estrona; PF, pair-fed.

<sup>A,B</sup>, Valors mitjos entre files amb diferents superíndexs són significativament diferents. (comparació *post hoc*, test de Bonferroni ; P<0.05)

† Significativitat de les diferències entre grups (ANOVA)

La taula 3 mostra els pesos absoluts i relatius del fetge i diferents músculs. En les rates tractades amb OE els pesos del fetge i dels músculs *soleus*, *tibialis* i *extensorum digitorum longus* es van mantenir iguals, però comptaven amb una menor massa de múscul *gastrocnemius* que els controls, tant a dia 10 com a 20. El grup PF va mantenir els valors de pesos musculars però van reduir els valors de fetge, tant a dia 10 com a 20. Així, el pes relatiu del fetge en PF era menor que en el grup control, contrastant amb els valors superiors observats en el grup OE a dia 20. Els músculs dels grups tractats va mantenir els valors relatius en comparació amb el grup control, excepte pel múscul *gastrocnemius* a dia 10. La comparació directa entre els grups OE i PF demostra que el pes del fetge i els músculs *gastrocnemius*, *tibialis* i *extensorum digitorum longus* eren diferents.

La taula 4 inclou els pesos relatius i absoluts dels teixits adiposos, i la mitjana del seu pes i el nombre cel·lular. El grup OE va mostrar teixits adiposos de menor pes, sent significatiu en el cas de la localització periovàrica a dia 10, i per totes les mostres adiposes a dia 20. El mateix patró es repetia pels pesos relatius d'aquests teixits. El nombre de cèl·lules disminuïa en els teixits adiposos periovàric i retroperitoneal amb el tractament amb OE, tant a dia 10 com a 20 del tractament. Els grups PF mostraren una tendència a pesos inferiors dels teixits adiposos, obtenint-se diferències significatives en retroperitoneal (a causa d'una disminució del nombre de cèl·lules) a dia 10, així com per a totes les mostres adiposes de dia 20. La comparança directa entre els grups OE i PF indica que el pes de teixit adipós blanc periovàric de la cèl·lula era també diferent entre aquests grups. El teixit adipós marró va resultar disminuït significativament per al grup PF a dies 10 i 20, mentre que en el grup OE aquesta disminució era significativa únicament pel dia 20.

La taula 5 presenta els valors de contingut en lípid, proteïna i glicogen del fetge i el múscul *gastrocnemius*. El tractament amb OE no va induir canvis en el contingut de metabòlits hepàtics i musculars, ni a dia 10 ni 20, llevat d'un petit augment en el contingut proteínic a dia 20. No obstant això, el grup del PF va mostrar un esgotament gairebé complet dels nivells de glicogen, particularment a dia 10, més marcat en fetge que en múscul. Hi va haver diferències significatives en la proteïna hepàtica, així com en el contingut de glicogen en fetge i múscul entre els grups OE i PF.

Taula 3. Pes del fetge i teixits musculars i pesos relatius (com a percentatge del pes corporal (%pc)), en rates Wistar femelles després de 10 o 20 dies de tractament \* (Valors mitjos amb errors estandar de sis animals per grup)

Paràmetre	Unitats	10 dies						20 dies						Pt
		Control		OE		PF		Control		OE		PF		
		Mitjana	SEM	Mitjana	SEM	Mitjana	SEM	Mitjana	SEM	Mitjana	SEM	Mitjana	SEM	
Fetge	g	9.94 ± 0.25 <sup>A</sup>	9.02 ± 0.28 <sup>A</sup>	6.68 ± 0.28 <sup>B</sup>	9.55 ± 0.32 <sup>A</sup>	10.1 ± 0.25 <sup>A</sup>	7.91 ± 0.38 <sup>B</sup>	0.0013	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
	% pc	3.88 ± 0.11 <sup>A</sup>	4.03 ± 0.16 <sup>A</sup>	2.96 ± 0.02 <sup>B</sup>	3.74 ± 0.10 <sup>A</sup>	4.52 ± 0.09 <sup>B</sup>	3.30 ± 0.10 <sup>B</sup>	0.0080	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Gastrocnemius	g	1.43 ± 0.08 <sup>A</sup>	1.19 ± 0.06 <sup>C</sup>	1.32 ± 0.08 <sup>A</sup>	1.54 ± 0.10 <sup>A</sup>	1.34 ± 0.09 <sup>B</sup>	1.51 ± 0.09 <sup>A</sup>	0.0006	0.0773	0.0773	0.0773	0.0059	0.0059	0.0059
	% pc	0.59 ± 0.02 <sup>A</sup>	0.52 ± 0.02 <sup>B</sup>	0.59 ± 0.02 <sup>A</sup>	0.60 ± 0.01 <sup>A</sup>	0.57 ± 0.01 <sup>A</sup>	0.63 ± 0.02 <sup>A</sup>	0.0042	0.0048	0.0048	0.0048	0.0051	0.0051	0.0051
Soleus	mg	101 ± 9 <sup>A</sup>	96 ± 9 <sup>A</sup>	104 ± 11 <sup>A</sup>	124 ± 10 <sup>A</sup>	127 ± 10 <sup>A</sup>	116 ± 9 <sup>A</sup>	0.0017	0.9594	0.9594	0.9594	0.8505	0.8505	0.8505
	% pc	0.042 ± 0.001 <sup>A</sup>	0.043 ± 0.003 <sup>A</sup>	0.046 ± 0.002 <sup>A</sup>	0.049 ± 0.002 <sup>A</sup>	0.055 ± 0.009 <sup>A</sup>	0.049 ± 0.002 <sup>A</sup>	0.0287	0.6309	0.6309	0.6309	0.7486	0.7486	0.7486
EDL	mg	107 ± 9 <sup>A</sup>	101 ± 10 <sup>A</sup>	112 ± 8 <sup>A</sup>	125 ± 10 <sup>A</sup>	113 ± 10 <sup>A</sup>	130 ± 11 <sup>A</sup>	0.0017	0.0441	0.0441	0.0441	0.0045	0.0045	0.0045
	% pc	0.044 ± 0.002 <sup>A</sup>	0.041 ± 0.006 <sup>A</sup>	0.050 ± 0.001 <sup>A</sup>	0.049 ± 0.003 <sup>A</sup>	0.048 ± 0.002 <sup>A</sup>	0.054 ± 0.003 <sup>A</sup>	0.0345	0.0249	0.0249	0.0249	0.0144	0.0144	0.0144
Tibial/s	mg	468 ± 12 <sup>A</sup>	421 ± 14 <sup>A</sup>	457 ± 13 <sup>A</sup>	511 ± 18 <sup>A</sup>	445 ± 15 <sup>A</sup>	512 ± 7 <sup>A</sup>	0.0259	0.0203	0.0203	0.0203	0.0386	0.0386	0.0386
	% pc	0.19 ± 0.004 <sup>A</sup>	0.18 ± 0.02 <sup>A</sup>	0.20 ± 0.005 <sup>A</sup>	0.20 ± 0.005 <sup>A</sup>	0.19 ± 0.007 <sup>A</sup>	0.21 ± 0.005 <sup>A</sup>	0.3756	0.0934	0.0934	0.0934	0.0691	0.0691	0.0691

OE, oleat d'estrona; PF, pair-fed.

<sup>A,B</sup>, Valors mitjos entre files amb diferents superíndexs són significativament diferents. (comparació *post hoc*, test de Bonferroni ; P<0.05)

† Significativitat de les diferències entre grups (ANOVA)



Taula 4. Pes absolut, pes relatiu (com a % del pes corporal (%pc)), nombre de cèl·lules i massa cel·lular de teixit adipós blanc (TAB) en rates femelles Wistar després de 10 o 20 dies de tractament \*  
(Valors mitjos amb errors estandar de sis animals per grup)

Paràmetre	10 dies						20 dies						Pt		
	Control		OE		PF		Control		OE		PF				
	Mitjana	SEM	Mitjana	SEM	Mitjana	SEM	Mitjana	SEM	Mitjana	SEM	Mitjana	SEM			
TAB Retroperitoneal	1.73 ± 0.18 <sup>A</sup>		1.25 ± 0.21 <sup>A</sup>		1.37 ± 0.16 <sup>A</sup>		2.52 ± 0.21 <sup>A</sup>		1.35 ± 0.15 <sup>B</sup>		1.56 ± 0.15 <sup>B</sup>		0.0265	0.0003	0.3744
% pc	0.78 ± 0.078 <sup>A</sup>		0.55 ± 0.086 <sup>A</sup>		0.61 ± 0.077 <sup>A</sup>		0.92 ± 0.119 <sup>A</sup>		0.73 ± 0.076 <sup>B</sup>		0.68 ± 0.075 <sup>B</sup>		0.0317	0.0003	0.1226
Nombre de cèl·lules x 10 <sup>6</sup>	144 ± 16.5 <sup>A</sup>		83.8 ± 10.2 <sup>B</sup>		97.6 ± 12.9 <sup>B</sup>		143 ± 10.0 <sup>A</sup>		79.1 ± 12.1 <sup>B</sup>		67.1 ± 13.4 <sup>B</sup>		0.3585	0.0001	0.9281
Massa cel·lular	12.7 ± 1.10 <sup>A</sup>		5.2 ± 1.92 <sup>A</sup>		15.4 ± 1.89 <sup>A</sup>		19.3 ± 2.04 <sup>A</sup>		18.3 ± 2.67 <sup>A</sup>		19.9 ± 2.37 <sup>A</sup>		0.0089	0.7215	0.6903
TAB Periováric	4.69 ± 0.25 <sup>A</sup>		2.74 ± 0.21 <sup>B</sup>		3.54 ± 0.35 <sup>A</sup>		5.71 ± 0.45 <sup>A</sup>		3.02 ± 0.22 <sup>B</sup>		3.99 ± 0.33 <sup>B</sup>		0.0916	<0.0001	0.0242
% pc	1.95 ± 0.117 <sup>A</sup>		1.21 ± 0.130 <sup>B</sup>		1.49 ± 0.147 <sup>A</sup>		2.23 ± 0.227 <sup>A</sup>		1.29 ± 0.125 <sup>B</sup>		1.58 ± 0.257 <sup>B</sup>		0.2431	<0.0001	0.0606
Nombre de cèl·lules x 10 <sup>6</sup>	328 ± 25.8 <sup>A</sup>		199 ± 11.8 <sup>B</sup>		372 ± 37.1 <sup>A</sup>		378 ± 65.8 <sup>A</sup>		206 ± 15.4 <sup>B</sup>		228 ± 16.6 <sup>B</sup>		0.3010	0.0005	0.0003
Massa cel·lular	14.9 ± 1.46 <sup>A</sup>		12.7 ± 1.78 <sup>A</sup>		9.85 ± 1.26 <sup>A</sup>		16.3 ± 1.66 <sup>A</sup>		14.8 ± 0.91 <sup>A</sup>		16.2 ± 1.78 <sup>A</sup>		0.0116	0.2611	0.6268
TAB Interescapular	365 ± 15 <sup>A</sup>		308 ± 20 <sup>AB</sup>		264 ± 20 <sup>B</sup>		401 ± 15 <sup>A</sup>		307 ± 22 <sup>B</sup>		327 ± 16 <sup>B</sup>		0.0782	0.0008	0.6179
% pc	0.151 ± 0.006 <sup>A</sup>		0.136 ± 0.008 <sup>A</sup>		0.118 ± 0.007 <sup>B</sup>		0.157 ± 0.010 <sup>A</sup>		0.130 ± 0.011 <sup>A</sup>		0.136 ± 0.012 <sup>A</sup>		0.3175	0.0079	0.5135

OE, oleat d'estrona; PF, pair-fed.

<sup>A,B</sup>, Valors mitjos entre files amb diferents superíndexs són significativament diferents. (comparació *post hoc*, test de Bonferroni; P<0.05)

† Significativitat de les diferències entre grups (ANOVA)

Taula 5. Contingut de metabòlits hepàtics i musculars en rates femelles Wistar després de 10 o 20 dies de tractament \*  
(Valors mitjos amb errors estandar de sis animals per grup)

Paràmetre	10 dies						20 dies						Pt		
	Control		OE		PF		Control		OE		PF				
	Mitjana	SEM	Mitjana	SEM	Mitjana	SEM	Mitjana	SEM	Mitjana	SEM	Mitjana	SEM			
Glicogen fetge (mg)	485 ± 39.1 <sup>A</sup>		352 ± 50.7 <sup>A</sup>		5.94 ± 1.71 <sup>B</sup>		518 ± 64.1 <sup>A</sup>		552 ± 45.4 <sup>A</sup>		127 ± 36.1 <sup>B</sup>		0.0055	0.0001	<0.0001
Lípid fetge (mg)	332 ± 19 <sup>A</sup>		308 ± 23 <sup>A</sup>		296 ± 13 <sup>A</sup>		274 ± 30 <sup>A</sup>		275 ± 32 <sup>A</sup>		303 ± 11 <sup>A</sup>		0.1228	0.8773	0.7295
Proteïna fetge (g)	1.77 ± 0.13 <sup>A</sup>		1.64 ± 0.08 <sup>AB</sup>		1.43 ± 0.09 <sup>B</sup>		1.53 ± 0.11 <sup>A</sup>		1.89 ± 0.11 <sup>B</sup>		1.66 ± 0.21 <sup>AB</sup>		0.2937	0.0837	0.0091
Glicogen múscul (mg)	3.06 ± 0.27 <sup>A</sup>		3.21 ± 0.44 <sup>A</sup>		1.42 ± 0.34 <sup>B</sup>		3.93 ± 0.63 <sup>A</sup>		3.43 ± 0.61 <sup>A</sup>		2.60 ± 0.78 <sup>A</sup>		0.0868	0.0150	0.0225
Lípid múscul (mg)	22.1 ± 2.11 <sup>A</sup>		16.3 ± 2.1 <sup>A</sup>		19.8 ± 2.1 <sup>A</sup>		24.5 ± 5.1 <sup>A</sup>		19.8 ± 1.3 <sup>A</sup>		19.0 ± 2.2 <sup>A</sup>		0.3098	0.0226	0.4098
Proteïna múscul (mg)	261 ± 11 <sup>A</sup>		242 ± 18 <sup>A</sup>		237 ± 23 <sup>A</sup>		306 ± 31 <sup>A</sup>		257 ± 13 <sup>A</sup>		272 ± 21 <sup>A</sup>		0.0148	0.0654	0.7461

OE, oleat d'estrona; PF, pair-fed.

<sup>A,B</sup>, Valors mitjos entre files amb diferents superíndexs són significativament diferents. (comparació *post hoc*, test de Bonferroni ; P<0.05)

† Significativitat de les diferències entre grups (ANOVA)

## DISCUSSIÓ

Les rates control han experimentat un creixement normal durant el tractament, així doncs l'energia addicional proporcionada per la dosi d'oli ha representat únicament un 3% (8.6 kJ/d) de l'energia provinent del pinso de la rata (265 kJ/d). Els nivells d'hormones i metabòlits en sèrum són similars als descrits prèviament (Grasa i col, 2001), amb la disminució dels nivells de colesterol i de colesterol HDL que constitueixen la prova més remarcable. Les disminucions del colesterol total detectades han estat pronunciades com havien estat descrites prèviament, sent la disminució de la fracció d'HDL contrarestada parcialment per l'increment del colesterol d'altres lipoproteïnes, principalment de la fracció de VLDL (Blay i col. 2002).

La resposta dels animals tractats amb OE en termes de pes corporal i d'ingesta va ser la mateixa que la descrita pel tractament de 10 dies habitual (Grasa i col, 2001), implicant una recuperació ràpida de la ingesta després d'un període curt de la restricció (prop al dia 4) que no va ser contrarestada per una recuperació del pes corporal. Aquesta seqüència d'esdeveniments va tenir dos períodes consecutius: els 10 dies inicials, on la restricció de la ingesta en els grups OE i PF va representar una disminució del 17% de l'energia ingerida pels controls (sobretot durant la primera meitat del període), i un segon període, on la restricció de la ingesta va representar només una disminució del 13% de l'energia ingerida pels controls. Es podria esperar que els efectes de la limitació de la ingesta d'energia en el grup OE resultessin més intensos en els grups tractats durant 10 dies que en els tractats 20 dies. No obstant això, els efectes induïts pel tractament o la restricció dietètica en els animals tractats durant 10 d afecta seriosament la recuperació, ja que l'augment parcial de la ingesta entre els dies 10 i 20 no va anar acompanyat d'una ràpida recuperació de pes. Com que les pendents de creixement eren similars a partir del dia 4 en endavant, les diferències de pes corporal es van mantenir entre els grups tractats i control. La pèrdua de massa del teixit adipós va ser el principal factor que va contribuir a la pèrdua de pes, tal i com s'havia observat en estudis anteriors (Grasa i col, 2001). Això també està d'acord amb el paper postulat per l'OE en la modificació de l'ajustament del ponderostat (Adan i col, 1999).

Podríem assumir que la disminució del pes corporal de les rates tractades amb OE és el resultat d'un balanç energètic negatiu producte d'una despesa energètica constant (Sanchis i col, 1997b) combinat amb una disminució de la ingesta energètica. Aquest desequilibri es dona principalment per la mobilització de lípids, segons ho confirma la pèrdua de teixit adipós de diverses localitzacions durant la primera meitat del període. De fet, aquesta pèrdua va ser mantinguda durant els segons 10 dies, tot i la recuperació d'uns valors relativament normals d'ingesta. La mobilització de lípids va persistir mentre es

mantenien uns nivells normals de glucosa i glicogen, indicant que la resposta del cos al desequilibri energètic era altament selectiva, és a dir que la l'emmagatzematge de reserves de carbohidrats es donaven juntament amb la mobilització de les reserves lipídiques. La tendència a augmentar els nivells de glicogen hepàtic en el grup d'animals OE a dia 20 està d'acord amb resultats publicats anteriorment (Sanchis i col, 1997a), i explica l'augment en pes relatiu.

La disminució de la massa del teixit adipós en els animals tractats amb OE va ser resultat de la corresponent disminució del nombre de cèl·lules, d'acord amb un predomini de mecanismes apoptòtics (Troyer i Fernandes, 1996). Aquests resultats estan parcialment d'acord amb patrons específics de gènere prèviament divulgats (Porter i col, 2004) en rates amb una ingesta energètica restringida, principalment pel que fa a la tendència de les femelles a mantenir el volum adipocitari, malgrat les diferents sensibilitats de les localitzacions adiposes.

El grup PF va seguir un patró de recuperació del creixement diferent que el grup OE, implicant uns canvis més pronunciats en el pes del fetge (resultat d'un esgotament gairebé total del glicogen i de la seva aigua associada) i més pronunciats que els observats en els teixits adiposos, especialment durant els primers 10 dies. Aquest patró es va conservar durant el segon període de 10 dies, ja que es van mantenir tant el baix pes del fetge com el del glicogen hepàtic. L'escassa mobilització del teixit adipós durant els primers 10 dies, quan només la localització retroperitoneal va mostrar una pèrdua significativa del pes malgrat la disminució del nombre de cèl·lules a dia 20, contrasta amb el patró de les rates tractades amb OE, i de fet, pot ser consistent amb una lipòlisi incrementada ja observada en aquests grups (Grasa i col, 2001). El patró metabòlic seguit pel grup PF va ser similar al induït per un dejuni a curt termini, amb nivells baixos de glucosa i una disminució dramàtica del glicogen hepàtic i muscular, juntament amb una pujada de marcadors de l'activitat lipolítica, com poden ser l'augment dels àcids grassos lliures i els cossos cetònics. Tals disminucions dels nivells del leptina i insulina donen suport a aquesta interpretació (Rabinovitch i col, 1976; Baranowska i col, 2001), així com l'augment dels nivells d'adiponectina (Zhang i col, 2002). Donat que durant els últims 4 dies, aquestes rates van menjar gairebé el 90% de la ingesta de les controls, segueix sent difícil atribuir uns canvis tant dràstics a un simple assaig de privació d'aliment, havent de considerar-se el possible paper de l'estrès generat per la limitació de disponibilitat l'aliment, com a factor intrínsec d'un model PF (Belda i col, 2005).

La restricció de la ingesta no afecta el metabolisme proteic ni en el grup OE ni en el PF. En les rates tractades amb OE els nivells estables de la urea, el manteniment (o l'augment a dia 20) del contingut proteic del fetge i la manca del canvis de pes relatiu en gairebé tots els músculs indiquen que la proteïna va ser preservada i confirma l'estabilitat

d'aquest teixit, tal i com ja s'havia apreciat prèviament (Cabot i col, 2000). No obstant això, la disminució del pes del múscul *gastrocnemius*, potser com a conseqüència de disminucions lleus del contingut de proteïna i lípid, qüestiona les diverses respostes metabòliques segons sigui la composició dels diversos tipus de fibres. Els efectes sobre el grup del PF són compatibles amb una possible pèrdua de massa protèica, similar als mecanismes subjacents d'un dejuni a curt termini, deguda particularment a la proteïna del fetge, com és evident per la disminució de nivells de la urea.

Les disminucions de nivells de la insulina i del leptina no són únicament característiques del tractament amb OE (Adán i col, 1999), sinó que també són constants amb el manteniment del balanç energètic a costa dels magatzems interns en el context del manteniment de l'homeòstasi interna. No obstant això, els patrons seguits pels grups OE i PF, malgrat presentar certes estratègies similars pel que fa a l'homeòstasi energètica, es diferencien notablement en la manera de mantenir l'homeòstasi de glucosa: esgotant el glicogen en el grup PF i disminuint la seva utilització en les rates tractades amb OE. Els canvis més pronunciats en els nivells d'insulina observats en el grup PF, juntament amb l'augment dels nivells d'adiponectina el dia 10, reforcen les diferents estratègies emprades pels grups OE i PF en el manteniment de les seves reserves glucídiques. D'altra banda, el patró lipolític seguit pels grups del PF i de OE és diferent, ja que la disminució del pes de TAB induïda per l'OE és més pronunciada que la causada per la restricció de l'aliment. Així, el grup OE no mostra canvis en els marcadors lipolítics del plasma, tals com els nivells d'àcids grassos lliures i 3-hidroxiabutirat, a diferència dels nivells augmentats del grup PF, que són causats probablement per un augment de l'activitat de la lipasa sensible a les hormones, així com en els períodes en estat de dejuni (Koopman i col, 1989). Aquest fet ens permet suggerir una utilització accelerada d'aquests metabòlits en el grup OE que podria explicar el manteniment de les reserves glucídiques.

El conjunt dels resultats actuals confirmen que la mobilització lipídica en rates tractades amb OE no és simplement una conseqüència de la ingesta. A més, podríem suggerir que el tractament amb OE induïx certs canvis selectius en el control de l'activitat simpàtica que probablement induïxin una mobilització selectiva dels lípids sense cap canvi a l'homeòstasi glucídica.

## REFERÈNCIES

Adán C, Cabot C, Vilà R, Grasa MM, Masanés RM, Esteve M, Estruch J, Fernández-López JA, Remesar X & Alemany M (1999) Oleoyl-estrone treatment affects the ponderostat setting differently in lean and obese Zucker rats. *Int J Obes* 23, 366–373.

Ardévol A, Virgili J, Sanchis D, Adán C, Fernández-Real JM, Fernández-López JA, Remesar X & Alemany M (1997) A method for the measurement of plasma estrone fatty ester levels. *Anal Biochem* 249, 247–250.

Baranowska B, Chmielowska M, Wolinska-Witort E, Roguski K & Wasilewska-Dziubinska E (2001) The relationship between neuropeptides and hormones in starvation. *Neuro Endocrinol Lett* 22, 249–355.

Belda X, Ons S, Carrasco J & Armario A (2005) The effects of chronic food restriction on hypothalamic-pituitary-adrenal activity depend on morning versus evening availability of food. *Pharmacol Biochem Behav* 81, 41–46.

Blay M, Peinado-Onsurbe J, Grasa MM, Díaz-Silva M, Fernández-López JA, Remesar X & Alemany M (2002) Effect of oral oleoyl-estrone treatment on plasma lipoproteins and tissue lipase activities of Zucker lean and obese female rats. *Int J Obes* 26, 618–626.

Cabot C, Grasa MM, Masanés RM, de Matteis R, Cinti S, Fernández-López JA, Remesar X & Alemany M (2001) Oleoyl-estrone does not have direct estrogenic effects on rats. *Life Sci* 69, 749–761.

Cabot C, Masanés R, Bulló M, García-Lorda P, Fernández-López JA, Salas-Salvadó J & Alemany M (2000) Plasma acyl-estrone levels are altered in obese women. *Endocr Res* 26, 465–476.

Comizio R, Pietrobelli A, Tan YX, Wang Z, Withers RT, Heymsfield SB & Boozer CN (1998) Total lipid and triglyceride response to energy deficit: relevance to body composition models. *Am J Physiol* 274, E860–E866.

Esteve M, Savall P, Virgili J, Fernández-López JA, Remesar X & Alemany M (2001) Modulation by leptin, insulin and corticosterone of oleoyl-estrone synthesis in cultured 3T3L1 cells. *Biosci Rep* 21, 755–763.

Fernández-Real JM, Sanchis D, Ricart W, Casamitjana R, Balada F, Remesar X & Alemany M (1999) Plasma oestrone-fatty acid ester levels are correlated with body fat mass in humans. *Clin Endocrinol* 50, 253–260.

Grasa MM, Cabot C, Esteve M, Yubero P, Masanés RM, Blay MT, Vilà R, López-Martí J, Fernández-López JA, Remesar X & Alemany M (2001) Daily oral oleoyl-estrone gavage induces a dose-dependent loss of fat in Wistar rats. *Obes Res* 9, 202–209.

Her PA, Hammond RP & Homolsky MW (1973) Sodium pump activity during norepinephrine-stimulated respiration in brown adipocytes. *Am J Physiol* 224, 1300–1304.

Koopman SJ, Sips HC, Bosman J, Radder JK & Krans HM (1989) Antilipolytic action of insulin in adipocytes from starved and diabetic rats during adenosine-controlled incubations. *Endocrinology* 125, 3044–3050.

Palou A, Remesar X, Arola L, Herrera E & Alemany M (1981) Metabolic effects of short-term food deprivation in the rat. *Hormone Metab Res* 13, 326–330.

Porter MH, Fine JB, Cutchings AG, Bai Y & DiGirolamo M (2004) Sexual dimorphism in the response of adipose mass and cellularity to graded caloric restriction. *Obesity Res* 12, 131–140.

Rabinovitch A, Grill V, Renold AE & Cerasi E (1976) Insulin release and cyclic AMP accumulation in response to glucose in pancreatic islets of fed and starved rats. *J Clin Invest* 58, 1209–1216.

Remesar X, Fernández-López JA, Blay MT, Savall P, Salas A, Díaz-Silva M, Esteve M, Grasa MM & Alemany M (2002) Effect of oleoyl-estrone on adipose tissue composition in male rats. *Int J Obes* 26, 1092–1102.

Sanchis D, Adán C, Ardévol A, Grasa MM, Cabot C, Balada F, Vilà R, Estruch J, Puerta M, Fernández-López JA, Remesar X & Alemany M (1997a) Short-term treatment with oleoyl-estrone in liposomes (Merlin-2) strongly reduces the expression of the ob gene in young rats. *Biochem J* 326, 357–360.

Sanchis D, Balada F, Grasa MM, Virgili J, Peinado J, Monserrat C, Fernández-López JA, Remesar X & Alemany M (1996) Oleoyl-estrone induces the loss of body fat in rats. *Int J Obes* 20, 588–594.

Sanchis D, Balada F, Picó C, Grasa MM, Virgili J, Farrerons C, Palou A, Fernández-López JA, Remesar X & Alemany M (1997b) Rats receiving the slimming agent Oleoyl-estrone in liposomes (Merlin-2) decrease food intake but maintain thermogenesis. *Archiv Physiol Biochem* 105, 663–672.

Serafini MT & Alemany M (1987) A micro method for the enzymatic estimation of the degree of glycogen ramification. *J Biochem Biophys Meth* 15, 33–39.

Troyer D i Fernandes G (1996) Nutrition and apoptosis. *Nutr Res* 16, 1959–1987.

Zhang Y, Matheny M, Zolokutukhin S, Tumer N & Scarpace PJ (2002) Regulation of adiponectin and leptin expression in white and brown adipose tissues: influence of beta-3-adrenergic agonists, retinoic acid, leptin and fasting. *Biochem Biophys Acta* 1584, 115–122.



## ***2. L'Oleat d'Estrona Incrementa el Recanvi de Colesterol en Plasma***

---

C. Cabot, A. Salas, R. Ferrer-Lorente, P. Savall, X. Remesar, JA. Fernández-López, M. Esteve and M. Alemany. Short-term oral oleoyl-estrone treatment increases plasma cholesterol turnover in the rat. *International Journal of Obesity* (2005), 29, 534-539



## INTRODUCCIÓ

L'oleat d'estrona és un senyal hormonal molt potent induint la pèrdua de greix corporal quan s'administra en dosis farmacològiques a rosegadors (Sanchis i col, 1996). L'administració oral provoca una pèrdua de pes dosi-dependent (Grasa i col, 2001), deguda principalment a la mobilització de lípid corporal. Aquesta utilització activa de les reserves lipídiques es duu a terme essencialment per la disminució dels dipòsits lipídics en teixit adipós blanc (Sanchis i col, 1996), i l'increment de la utilització de lípids en múscul (Blay i col, 2002) que provoca una marcada davallada del quocient respiratori (Sanchis i col, 1996), mantenint la proteïna en un context en què la ingesta d'aliment es troba reduïda i el consum energètic mantingut (Sanchis i col 1997). El tractament crònic amb oleat d'estrona també indueix una disminució dels nivells d'insulina i de la resistència a la insulina, amb un manteniment de la glucosa plasmàtica i el glicogen hepàtic (Sanchis i col, 1997b; Adan i col, 1999). El desequilibri entre el manteniment del consum energètic i la disminució de la ingesta energètica induïda pel tractament amb oleat d'estrona es manté a expenses de les reserves lipídiques (Grasa i col, 2001); la massiva mobilització del lípid del teixit adipós, i la seva oxidació (Sanchis i col, 1996; Remesar i col, 2002), estalvia glucosa i proteïna (Sanchis i col 1997), incrementant el transport de lípids per la sang.

Els efectes de l'oleat d'estrona en els lípids plasmàtics s'ha estudiat habitualment en rates després de 10 dies de tractament. No obstant això, els efectes de l'oleat d'estrona sobre la ingesta d'aliment ja s'observen passades 2 hores de l'administració oral de la hormona (Remesar i col, 2000). L'oleat d'estrona redueix el colesterol circulant, especialment en la fracció HDL (Sanchis i col, 1996), però no altera el pool de colesterol corporal en grau significatiu (Remesar i col, 2000); així, qualsevol canvi en la dinàmica del colesterol plasmàtic podria reflectir modificacions en el recanvi de lipoproteïnes a més de canvis eventuals en la taxa de síntesi o excreció del colesterol. Donat que la mobilització de colesterol i el seu transport per la sang és un dels efectes més marcats de l'oleat d'estrona en el metabolisme lipídic, hem estudiat la taxa de recanvi de colesterol en plasma de rata poc temps després d'una única dosi d'oleat d'estrona, quan la mobilització massiva de lípids encara no ha estat completament establerta.

## RESULTATS

La taula 1 presenta els canvis a curt termini induïts pel tractament amb OE. La variació del pes corporal a 2 dies va ser petita però estadísticament significativa. La ingesta acumulada d'aliment va ser inferior en les rates tractades amb OE des de l'inici: en les primeres 3 hores, el grup OE van ingerir només la meitat de l'aliment ingerit pels control,

independentment d'haver rebut una dosi d'oli de 7kJ ambdós grups. En tot el període de 48 hores, el grup OE va ingerir un 32% menys d'aliment que els controls.

La glucosa plasmàtica no va variar amb el tractament amb OE, però va incrementar amb el temps. Els nivells d'insulina van ser pràcticament mantinguts en els controls, però van disminuir una tercera part respecte dels control a partir de les 6 hores. L'índex HOMA va mostrar que la resistència a la insulina tendia a incrementar en els controls però es mantenia baix en els animals tractats amb OE.

Taula 1. Canvi de pes, ingesta i paràmetres plasmàtics de rates Wistar a diferents temps després de l'inici del tractament amb oleat d'estrona

Paràmetre	Unitats	Grup	0 hores	3 hores	6 hores	24 hores	48 hores	P (temps)	P (OE)
Pes corporal	% inicial	Control	100	98.0 ± 0.54	98.8 ± 0.83	100.2 ± 0.57	101.0 ± 0.91	<b>0.029</b>	<b>&lt;0.001</b>
		OE		99.7 ± 0.65	97.7 ± 0.41	98.1 ± 0.33*	96.9 ± 0.78*		
Ingesta acumulada	g	Control	0	2.6 ± 0.3	2.7 ± 0.5	19.7 ± 1.1	43.3 ± 3.1	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>
		OE		1.1 ± 0.3	1.5 ± 0.5	14.4 ± 1.3	29.5 ± 2.3		
Glucosa	mM	Control	7.05 ± 0.10	7.31 ± 0.15	7.42 ± 0.31	8.00 ± 0.28*	7.82 ± 0.19*	<b>0.013</b>	0.393
		OE		7.52 ± 0.21	7.09 ± 0.24	7.68 ± 0.23	7.59 ± 0.29		
Insulina	nM	Control	0.34 ± 0.03	0.26 ± 0.02	0.34 ± 0.04	0.35 ± 0.04	0.34 ± 0.03	0.771	<b>0.041</b>
		OE		0.25 ± 0.04	0.24 ± 0.02	0.23 ± 0.03	0.23 ± 0.03		
Índex HOMA		Control	13.6 ± 1.09	12.2 ± 1.2	13.8 ± 0.6	17.6 ± 2.18	17.1 ± 1.4	0.334	<b>0.002</b>
		OE		11.5 ± 2.1	10.8 ± 1.0	11.4 ± 1.14*	11.1 ± 1.6*		
Colesterol total	mM	Control	1.48 ± 0.13	1.83 ± 0.19	1.75 ± 0.08	1.56 ± 0.10	1.50 ± 0.13	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>
		OE		1.72 ± 0.04	1.18 ± 0.02*	0.96 ± 0.08*	0.90 ± 0.04*		
Colesterol HDL	mM	Control	1.05 ± 0.10	1.20 ± 0.13	1.16 ± 0.16	0.99 ± 0.16	1.00 ± 0.16	<b>0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>
		OE		1.03 ± 0.20	0.71 ± 0.04	0.28 ± 0.04*	0.23 ± 0.02*		
Colesterol HDL/total		Control	0.70 ± 0.07	0.64 ± 0.03	0.68 ± 0.08	0.66 ± 0.07	0.66 ± 0.07	<b>0.003</b>	<b>&lt;0.001</b>
		OE		0.61 ± 0.09	0.62 ± 0.01	0.27 ± 0.05*	0.24 ± 0.01*		
Àcids grassos lliures	mM	Control	0.69 ± 0.06	0.69 ± 0.04	0.59 ± 0.07	0.58 ± 0.08	0.52 ± 0.08	0.497	0.301
		OE		0.66 ± 0.06	0.66 ± 0.04	0.64 ± 0.08	0.64 ± 0.04		
3-hidroxiacetilcolina	mM	Control	0.25 ± 0.04	0.34 ± 0.08	0.23 ± 0.01	0.37 ± 0.02	0.28 ± 0.02	0.065	<b>0.031</b>
		OE		0.58 ± 0.16	0.45 ± 0.06	0.42 ± 0.01	0.30 ± 0.06		
Triacilglicerols	mM	Control	0.81 ± 0.10	0.64 ± 0.09	0.64 ± 0.09	0.85 ± 0.12	0.89 ± 0.12	0.239	0.923
		OE		0.90 ± 0.08	0.90 ± 0.08	0.86 ± 0.11	0.82 ± 0.10		

Mitjanes ± SEM de les dades de 6 animals per grup. Comparacions estadístiques entre grups determinades mitjançant ANOVA de dos factors. Els P-valors estadísticament significatius es presenten en negreta. \*P < 0.05 vs controls (test Bonferroni *post hoc*)

Les rates tractades amb OE van reduir tant els nivells de colesterol total com el colesterol HDL amb el temps. En el grup control, el quocient colesterol HDL/colesterol total es va mantenir entre el 64-70% durant tot l'experiment, però en les rates tractades amb OE va disminuir constantment, baixant a 61% a les 3 hores i fins a un mínim de 24% després de 2 dies (15% a les 72 hores). Així, la davallada del colesterol circulant va afectar més profundament el colesterol HDL que no pas el colesterol lliure.

Altres paràmetres metabòlics lipídics en plasma van mostrar petits canvis a curt termini del tractament amb OE. No es va trobar diferències degudes al tractament o al temps en triacilglicerols i àcids grassos lliures. Els nivells de 3-hidroxiabutirat mostraren un lleuger increment inicial en les rates tractades amb OE que posteriorment es va normalitzar. Les dades de decaïment del marcatge corresponents a l'experiment de recanvi es poden veure a la figura 1. El marcatge de colesterol lliure disminueix ràpidament a valors molt baixos de radioactivitat en la primera mitja hora després de la injecció. No obstant, el marcatge en la fracció de colesterol esterificat decreix molt més lentament. Les dades després de 6 hores de l'administració de la dosi van ser força similars, tant pel colesterol com pel colesterol esterificat, a les obtingudes després de 3 dies de tractament. L'OE va accelerar la desaparició del marcatge de colesterol esterificat tant a 6 com a 72 hores de la primera dosi d'OE. A la taula 2 es mostren les vides mitjanes calculades per cada sèrie de dades. La aproximació de les dades a la corba de decaïment va resultar en tots els casos amb un valor  $r$  superior a 0.95. L'OE va escurçar els valors de vida mitja pel colesterol esterificat sense produir canvis en el colesterol lliure; els controls també van experimentar un efecte significatiu de reducció amb el temps (de manera menys intensa, no obstant, que pel tractament amb OE) dels valors de vida mitja dels esters de colesterol amb la durada de les dosis.

Taula 2. Canvis en els pools de colesterol plasmàtics i vida mitja del colesterol en rates Wistar tractades oralment amb oleat d'estrona

Parametre	Unitats	Controls		OE		P-valors	
		6 h	72 h	6 h	72 h	temps	OE
Nivells de colesterol total	mM	1.23 ± 0.18	1.12 ± 0.10	0.83 ± 0.08	0.96 ± 0.09	0.969	<b>0.024</b>
Nivells de colesterol HDL	mM	0.64 ± 0.10	0.67 ± 0.09	0.36 ± 0.05	0.14 ± 0.02	0.088	<b>&lt;0.001</b>
Pool plasmàtic de colesterol total	µmol	8.17 ± 1.12	8.92 ± 0.75	5.35 ± 0.53	6.83 ± 0.66	0.178	<b>0.009</b>
Pool plasmàtic de colesterol lliure	µmol	3.90 ± 0.53	3.58 ± 0.66	3.00 ± 0.74	5.82 ± 0.77	0.155	0.432
Pool plasmàtic de colesterol HDL	µmol	4.27 ± 0.69	5.34 ± 0.72	2.34 ± 0.32	1.02 ± 0.13	0.794	<b>&lt;0.001</b>
Vida mitja del colesterol lliure plasmàtic	min	10.3 ± 1.8	10.2 ± 1.2	10.6 ± 1.6	8.7 ± 0.7	0.696	0.635
Vida mitja de l'èster de colesterol plasmàtic	min	275 ± 53	211 ± 12	196 ± 37	110 ± 16	<b>0.016</b>	<b>0.002</b>

Mitjanes ± SEM de les dades de 6 animals per grup. Comparacions estadístiques entre grups determinades mitjançant ANOVA de dos factors. Els  $P$ -valors estadísticament significatius es presenten en negreta.

No es van observar canvis en el pool de colesterol lliure en plasma. No obstant, en les rates tractades amb OE, el pool de colesterol HDL es va reduir en un 51% (en el període de 6 hores), i un 19% (després de 72 hores) del pool inicial de colesterol HDL.

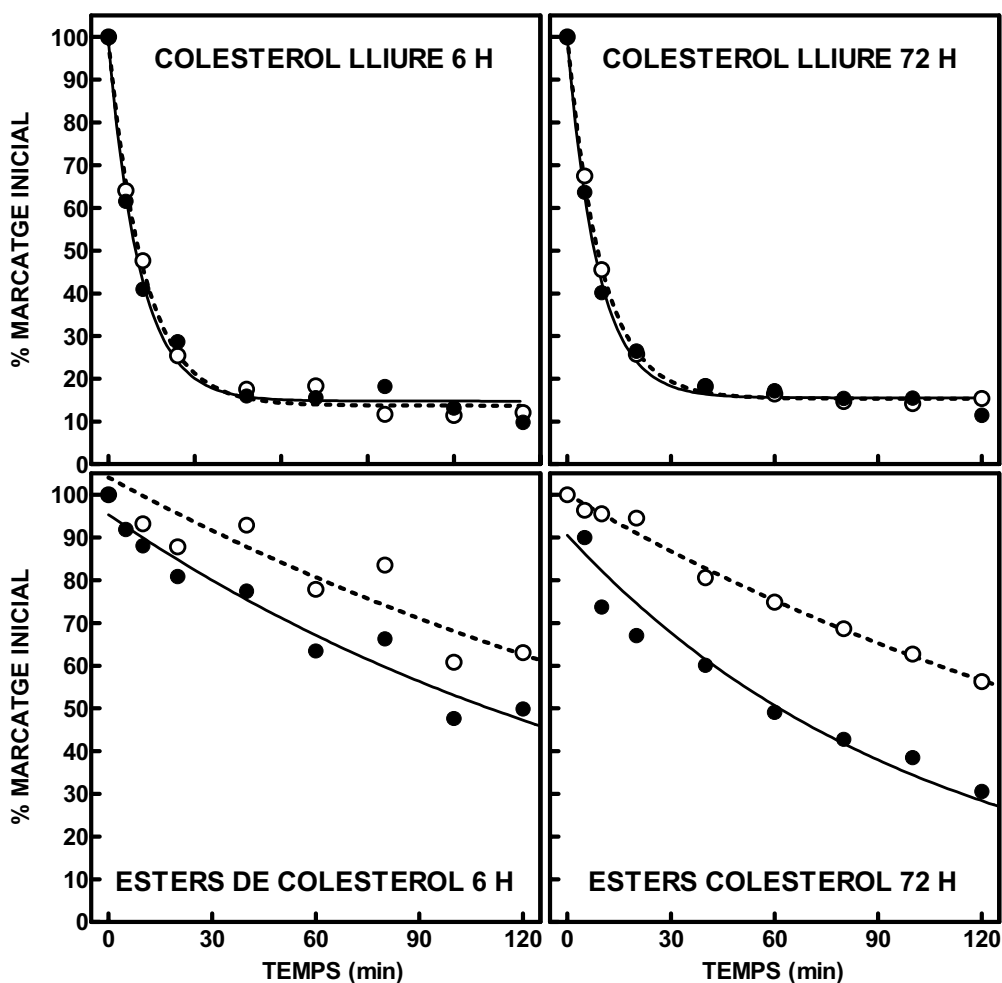


Figura 1. Decaïment del marcatge de Colesterol lliure i esterificat en rates control i tractades amb OE, 6 i 72 hores després de rebre la primera dosi. Controls: cercles blancs i línia discontinua; OE: cercles negres i línia continua. Les dades representen la mitjana  $\pm$  SEM de 5 rates diferents.

## DISCUSSIÓ

Aquest estudi mostra com l'OE, a més dels seus coneguts efectes a mig i llarg termini sobre la homeòstasi energètica corporal, indueix també canvis metabòlics molt primerencs. No es van observar canvis rellevants en els nivells d'àcids grassos, triacilglicèrids o cossos cetònics, no obstant, les acusades modificacions dels nivells de colesterol, la mida del pool i el recanvi suggereixen una ràpida potenciació del transport interòrgan dependent de lipoproteïnes del colesterol i el seu metabolisme.

La sensibilitat a la insulina va incrementar significativament tal i com ho indica l'índex HOMA. Aquesta modulació de la sensibilitat a la insulina, que resulta d'una glucèmia mantinguda i una reducció dels nivells insulínics, va ser un dels primers efectes atribuïts al

tractament oral amb OE. És ben sabut que l'OE disminueix la resistència a la insulina (Sanchis i col, 1997b; Adan i col, 1999), però mai s'havia descrit aquests efectes a curt termini.

El ràpid recanvi de colesterol lliure en plasma no va ser diferent entre les rates tractades amb OE i els controls; no obstant això, quan es prenen totes les dades en conjunt amb la més ràpida disponibilitat de colesterol esterificat deguda al tractament amb OE, la tendència a incrementar la mobilització de colesterol plasmàtic per l'OE esdevé significativament. El principal efecte de l'OE en el colesterol plasmàtic, doncs, pot ser donat per un increment del recanvi i la reducció del pool de colesterol esterificat, un altre indicador de l'acceleració del transport lipoproteïnes paral·lelament amb una pèrdua de teixit adipós blanc i una activa oxidació lipídica (Sanchis i col, 1997; Remesar i col, 2002).

La resistència a la insulina altera la gestió metabòlica de lipoproteïnes, i així també el de colesterol HDL (Ferreira i col, 2001; Ruotolo i Howard, 2002). La hiperinsulinèmia també incrementa la síntesi i disminueix l'absorció de colesterol (Pihlajamäki i col, 2004). No obstant, els canvis en els nivells de colesterol es relacionen de manera habitual més directament a les conseqüències derivades de la resistència a la insulina i a la hiperinsulinèmia (Couillard i col, 1996) que no pas als canvis en la sensibilitat a la insulina tal i com s'observa en aquest cas. A més, la majoria dels efectes de la resistència a la insulina en els nivells de colesterol són mitjançats per la gestió metabòlica de lipoproteïnes, així com els romanents de quilomicrons (Ohnishi i col, 2002; Chan i col, 2003) o la modulació de la lipoproteïna lipasa (Ferreira i col, 2001; Panarotto i col, 2002). La manca de canvis en els triacilglicerols circulants fa pensar que no es donen grans canvis en la lipoproteïna lipasa, però sabem que l'OE induïx una disminució marcada de la lipoproteïna en teixit adipós i un increment en múscul (Blay i col, 2002) que faciliten la transferència de l'energia lipídica del teixit adipós cap als teixits perifèrics. Això vol dir que l'estat estacionari dinàmic dels triacilglicerols i àcids grassos lliures plasmàtics està mantingut, però la gestió metabòlica de lipoproteïnes està accelerada pel tractament amb OE (Blay i col, 2002). Les dades que aquí es presenten estan d'acord amb aquesta interpretació.

Els canvis primerencs en la sensibilitat a la insulina induïts per l'OE no poden explicar per ells sols els canvis tan marcats en la gestió metabòlica de colesterol, essencialment una conseqüència d'un recanvi de colesterol accelerat. No obstant, l'increment de la velocitat de recanvi dels esters de colesterol observats en el temps pot ser, com a mínim en part, una conseqüència de la reducció de la resistència a la insulina, tenint en compte que la insulina controla aquest procés (Riemens i col, 2001). Aquest procés pot estar controlat, en certa manera, per la marcada disminució de la lipasa hepàtica promoguda per l'OE (Blay i col, 2002), que podria limitar eficientment la disposició de colesterol pel fetge. L'efecte conjunt

de la sensibilitat a la insulina i l'increment del recanvi de lípids de les lipoproteïnes podria explicar els acusats i primerencs efectes hipocolesterolèmics de l'OE.

## REFERÈNCIES

Adán C, Cabot C, Esteve M, Grasa MM, Masanés R, Vilà R, Estruch J, Fernández-López JA, Remesar X, Alemany M (1999) Oleoyl-estrone treatment affects the ponderostat setting differently in lean and in obese Zucker rats. *Int J Obesity* 22: 366-373

Blay M, Peinado-Onsurbe J, Grasa MM, Díaz-Silva M, Fernández-López JA, Remesar X, Alemany M. Effect of oral oleoyl-estrone treatment on plasma lipoproteins and tissue lipase and lipase activities of Zucker lean and obese female rats. *Int J Obesity* 2002; 26: 618-626

Bonora E, Targher G, Alberiche M, Bonadonna RC, Saggiani F, Zenere MA et al. Homeostasis model assessment closely mirrors the glucose clamp technique in the assessment of insulin sensitivity. *Diabet Care* 2000; 23: 57-63

Chan DC, Watts GF, Barrett PHR, O'Neill FH, Redgrave TG, Thompson GR. Relationships between cholesterol homeostasis and triacylglycerol-rich lipoprotein remnant metabolism in the metabolic syndrome. *Clin Sci* 2003; 104: 383-388

Couillard C, Lamarche B, Tchernof A, Prud'homme D, Tremblay A, Bouchard C, Moorjani S, Nadeau A, Lupien PJ, Després JP. Plasma high-density lipoprotein cholesterol but not apolipoprotein A-I is a good correlate of the visceral obesity- insulin resistance dyslipidemic syndrome. *Metabolism* 1996; 45: 882-888

Dell RB, Mott GE, Jackson EM, Ramakrishnan R, Carey KD, McGill HC, Goodman DWS. Whole body and tissue cholesterol turnover in the baboon. *J Lipid Res* 1985; 26: 327-337

Ferreira LDMC, Pulawa LK, Jensen DR, Eckel RH. Overexpressing human lipoprotein lipase in mouse skeletal muscle is associated with insulin resistance. *Diabetes* 2001; 50: 1064-1068

Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 1957; 232: 497-509

Grasa MM, Cabot C, Esteve M, Yubero P, Masanés RM, Blay M, Vilà R, López-Martí J, Fernández-López JA, Remesar X, Alemany M. Daily oral oleoyl-estrone gavage induces a dose-dependent loss of fat in Wistar rats. *Obes Res* 2001; 9: 202-209

Hobbs JT. Total blood volume – its measurement and significance. *Medical Monographs*. Amersham: The Radiochemical Centre. 1987



Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Teacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and B cell function from fasting plasma glucose and insulin concentration in man. *Diabetologia* 1985; 28: 412-419

Ohnishi H, Saitoh S, Takagi S, Ohata J, Isobe T, Kikuchi Y, Takeuchi H, Shimamoto K. Relationship between insulin-resistance and remnant-like particle cholesterol. *Atherosclerosis* 2002; 164: 167-170

Panarotto D, Remillard P, Bouffard L, Maheux P. Insulin resistance affects the regulation of lipoprotein lipase in the postprandial period and in an adipose tissue-specific manner. *Eur J Clin Invest* 2002; 32: 84-92

Pihlajamäki J, Gylling H, Miettinen TA, Laakso M. Insulin resistance is associated with increased cholesterol synthesis and decreased cholesterol absorption in normoglycemic men. *J Lipid Res* 2004; 45: 507-512

Remesar X, Fernández-López JA, Blay MT, Savall P, Salas A, Díaz-Silva M, Esteve M, Grasa MM, Alemany M. Effect of oral oleoyl-estrone on adipose tissue composition in male rats *Int J Obesity* 2002; 26: 1092-1102

Remesar X, Guijarro P, Torregrosa C, Grasa MM, López J, Fernández-López JA, Alemany M. Oral oleoyl-estrone induces the rapid loss of body fat in Zucker lean rats fed a hyperlipidic diet. *Int J Obesity* 2000; 24: 1405-1412

Riemens SC, van Tol A, Scheek LM, Dullaart RPF. Plasma cholesteryl ester transfer and hepatic lipase activity are related to high-density lipoprotein cholesterol in association with insulin resistance in type 2 diabetic and non-diabetic subjects. *Scand J Clin Lab Invest* 2001; 61: 1-9

Robins SJ, Fasulo JM, Collins MA, Patton GM. Cholesterol exchange and synthesis in the live rat. *J Lipid Res* 1985; 26: 1230-1240

Ruotolo G, Howard BV. Dyslipemia of the metabolic syndrome. *Curr Cardiol Rep* 2002; 4: 494-500

Sanchis D, Adán C, Ardévol A, Grasa MM, Cabot C, Balada F, Vilà R, Estruch J, Puerta ML, Fernández-López JA, Remesar X, Alemany M. Short-term treatment with oleoyl-estrone in liposomes (Merlin-2) strongly reduces the expression of the ob gene in young rats. *Biochem J* 1997; 326: 357-3608

Sanchis D, Balada F, Grasa MM, Virgili J, Peinado J, Monserrat C, Fernández-López JA, Remesar X, Alemany M. Oleoyl-estrone induces the loss of body fat in rats. *Int J Obesity* 1996; 20: 588-594

Sanchis D, Balada F, Picó C, Grasa MM, Virgili J, Farrerons C, Palou A, Fernández-López JA, Remesar X, Alemany M. Rats receiving the slimming agent oleoyl-estrone in liposomes (Merlin-2) decrease food intake but maintain thermogenesis. *Arch Physiol Biochem* 1997; 105: 663-672

Touchstone JC. Thin layer chromatographic procedures for lipid separation. *J Chromatogr B* 1995; 671: 169-195.

### ***3. El Tractament a Curt Termini amb Oleat d'Estrona Afecta Selectivament l'Expressió de PPAR ( $\gamma$ i $\beta$ ) i $TNF\alpha$ en Diverses Localitzacions de Teixit Adipós Blanc***

---

A. Salas, X. Remesar and M. Esteve. Short-term Oleoyl-estrone treatment affects selectively the expression of PPAR ( $\gamma$  and  $\beta$ ) and  $TNF\alpha$  in different locations of rat white adipose tissue. Treball enviat a la revista Int. J. Obesity (Maig 2006)



## INTRODUCCIÓ

L'administració experimental d'oleat d'estrone (OE) indueix selectivament la pèrdua de greix corporal, sense la corresponent pèrdua de proteïna corporal (Sanchis i col, 1996; Grasa i col, 2001). L'OE és sintetitzat per les cèl·lules adiposes a partir d'estrone (Esteve i col, 2001) i s'allibera després a circulació sanguínia, on la seva concentració està correlacionada amb la massa grassa corporal (Fernandez-Real i col, 1999; Cabot i col, 2000). Aquest compost s'ha proposat com un senyal lipostàtic que regula la massa grassa de l'organisme. La reducció selectiva de contingut de greix és una conseqüència directa de la pèrdua de massa de teixit adipós en diverses zones (Remesar i col, 2002). L'acció de l'OE sobre el teixit adipós implica una sèrie de vies apoptòtiques (Salas i col, 2004), particularment en les localitzacions periovàrica i mesentèrica. No obstant, el mecanisme que duu a terme l'acció de l'OE és encara desconegut.

Els canvis en pes i en contingut lipídic del teixit adipós són les conseqüències finals d'un complex balanç entre processos anabòlics i catabòlics, regulats per nombrosos factors entre els que trobem múltiples citoquines que es sintetitzen en aquest teixit (Trayhurn i Wood, 2004). Molts factors controlen aquests processos, però la família PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor) i d'altres citoquines com  $TNF\alpha$  (tumor necrosis factor) són, algunes de les més actives. Així doncs, els PPARs activen gens diana a través de la unió a elements de resposta i poden induir una sèrie de respostes. PPAR $\beta$ , expressat ubiqüament, és un factor antiobesitat molt actiu (Barish i col, 2006) pel seu efecte activador de l'oxidació de lípids i la termogènesi en teixit adipós. Contràriament, PPAR $\gamma$  està considerat el factor pro-adipogènic més actiu (Fajas i col, 2001), degut la seva capacitat per controlar el cicle cel·lular, i d'induir efectes pro-tumorogènics. No obstant, l'activitat de PPAR $\gamma$  està causada per dues proteïnes, la forma 1 i la 2, sent l'última gairebé específica de teixit adipós (Semple i col, 2006). A més, les accions d'aquests factors poden ser regulades per  $TNF\alpha$ , ja que aquest inhibeix la diferenciació i promou l'apoptosi (Petruschke i Hauner, 1993; Grohmann i col, 2005).

En aquest treball, s'examina els efectes del tractament amb OE a temps curt sobre l'expressió d'aquests factors pro i anti-adipogènics.

## RESULTATS

Els animals tractats amb OE durant 48 hores van mostrar un 25% de reducció de la ingesta i un 5% de disminució del pes corporal. En canvi, els controls mostraren un 2% d'increment del pes corporal van mantenir la seva taxa d'ingesta (dades no mostrades).

El tractament amb OE va induir un increment significatiu en la concentració de DNA en TAB periovàric, mentre que la massa cel·lular va créixer significativament (Taula 1). Els canvis induïts pel tractament en altres localitzacions no van ser significants.

Paràmetre	Control		OE	
	Mitjana	SEM	Mitjana	SEM
<b>TAB mesentèric</b>				
μDNA/mg teixit	0.55 ± 0.05		0.43 ± 0.07	
Pes cel·lular (ng)	11.1 ± 1.02		14.9 ± 2.74	
<b>TAB Periovàric</b>				
μDNA/mg teixit	0.22 ± 0.03		0.37 ± 0.05*	
Pes cel·lular (ng)	27.8 ± 3.27		17.1 ± 3.12*	
<b>TAB Subcutani</b>				
μDNA/mg teixit	0.38 ± 0.04		0.53 ± 0.07	
Pes cel·lular (ng)	16.1 ± 1.72		11.5 ± 1.52	
<b>TAB Retroperitoneal</b>				
μDNA/mg teixit	0.24 ± 0.03		0.28 ± 0.04	
Pes cel·lular (ng)	25.7 ± 3.49		21.5 ± 2.78	

Taula 1. Concentració de DNA i massa cel·lular de localitzacions de teixit adipós blanc de rata. Diferències significatives: test t Student. \*=P<0,05 (Valors mitjos amb errors estandar de sis animals per grup)

L'expressió de PPAR $\gamma$ 2 va créixer en TAB mesentèric, mentre que l'expressió de PPAR $\beta$  va incrementar en el teixit periovàric i va disminuir en teixit adipós subcutani (Figura 1). L'expressió de TNF $\alpha$  mostrava una reducció significativa en les localitzacions periovàrica i retroperitoneal.

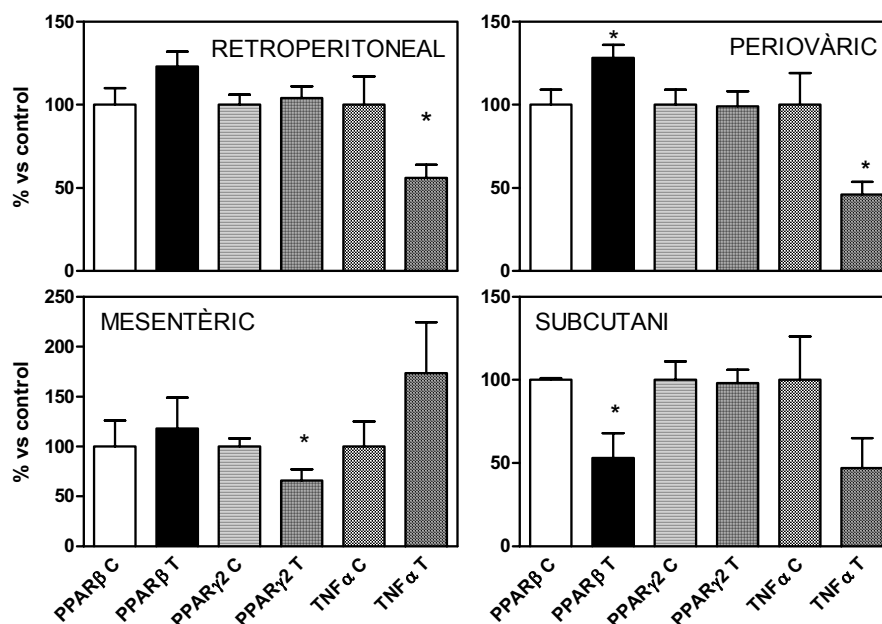


Figura 1. Quantificació de PPAR $\beta$ , PPAR $\gamma$ 2 i TNF $\alpha$  en mostres de teixit adipós blanc: retroperitoneal, periovaric mesentèric i subcutani de rates tractades amb OE durant 48 hores. Les fotos mostren els nivells d'RNAm basat en electroforesi en agarosa. Les figures expressen els nivells d'RNAm, com a valors corregits per l'expressió de ciclofilina i expressada com a percentatge dels controls. Els resultats reflecteixen la mitjana  $\pm$  SEM de 5 experiments diferents. Els asteriscs indiquen diferències significatives: \* P<0.05.

## DISCUSSIÓ

El tractament de 2 dies amb OE va produir els mateixos efectes en el pes corporal que els descrits prèviament (Cabot i col, 2005; Salas i col, 2005). Per altra part, aquesta durada del tractament és suficient per produir un increment de l'expressió de diversos factors de les vies apoptòtiques (Salas i col, 2004) en algunes localitzacions adiposes.

La disminució de l'expressió de TNF $\alpha$  en el TAB retroperitoneal i periovaric impliquen una manca d'acció inhibidora d'aquest factor sobre l'adipogènesi, i/o sobre l'activació de la mobilització lipídica, i/o la seva acció de "down-regulació" sobre gens tals com PPAR $\gamma$  (Zhang i col, 1996). No obstant, la manca de variació en l'expressió de PPAR $\gamma$ 2 contribueix al manteniment del balanç cel·lular en el teixit retroperitoneal. En el cas del teixit periovaric, l'increment de PPAR $\beta$  podria explicar l'estimulació de la capacitat lipolítica, tal i com es dedueix de l'increment de la concentració de DNA i el pes cel·lular. Aquesta observació indica que la localització periovarica ha de tenir una taxa superior d'inducció de la mobilització lipídica induïda per l'OE que la resta de dipòsits adiposos, com són el mesentèric o el subcutani, que no mostren canvis significatius en l'expressió de TNF $\alpha$ . No obstant, l'expressió reduïda de PPAR $\gamma$ 2 en teixit adipós mesentèric indica una reducció de la capacitat

adipogènica, que minva quan incrementa l'activitat apoptòtica (Salas i col, 2004), de tal manera que es manté el balanç tot i el metabolisme actiu que se li atribueix a aquesta localització (Wajchenberg, 2000). En canvi, en el teixit adipós subcutani, la possible disminució de l'activitat lipolítica causada per la reducció de l'expressió de PPAR $\beta$  no està compensada i per tant no s'observen grans canvis en el pes cel·lular.

Els resultats exposats indiquen que la resposta del teixit adipós al tractament a curt termini de l'OE varia dràsticament en funció de la localització del teixit, resultant el més sensible el dipòsit periovàric. Els canvis d'expressió en PPAR $\gamma$ 2, PPAR $\beta$  i TNF $\alpha$  difereixen força, cosa que ens indica una interacció complexa de l'OE en les diferents localitzacions adiposes. Aquesta interacció provoca un rang de balanços entre factors pro- i anti-adipogènics i per tant obre la possibilitat de gestionar les reserves adiposes. Així doncs, la complexa resposta al tractament amb OE depèn de les característiques específiques dels teixits adiposos, amb la conseqüent possible manca d'uniformitat en resposta al tractament.

## REFERÈNCIES

Barish GD, Narkar VA, Evans RM. PPAR $\delta$ : a dagger in the heart of the metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2006; 116: 590-597.

Cabot C, Masanés R, Bulló M, García-Lorda P, Fernández-López JA, Salas-Salvadó J, Alemany M. Plasma acyl-estrone levels are altered in obese women. *Endocr Res* 2000; 26: 465-476.

Cabot C, Salas A, Ferrer-Lorente, R, Savall P, Remesar X, Fernández-López JA, Esteve M, Alemany M. Short-term oral oleoyl-estrone treatment increases plasma cholesterol turnover in the rat. *Int J Obes* 2005; 29: 534-539.

Esteve M, Savall P, Virgili J, Fernández-López JA, Remesar, Alemany M. Modulation by leptin, insulin and corticosterone of oleoyl-estrone synthesis in cultured 3T3L1 cells. *Biosci Rep* 2001; 21: 755-763.

Fajas L, Debril MB, Auwerx J. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ : from adipogenesis to carcinogenesis. *J Mol Endocrinol* 2001; 27: 1-9.

Fernández-Real JM, Sanchis D, Ricart W, Casamitjana R, Balada F, Remesar X, Alemany M. Plasma oestrone-fatty acid ester levels are correlated with body fat mass in humans. *Clin Endocrinol* 1999; 50: 253-260.



Grasa MM, Cabot C, Esteve M, Yubero P, Masanés RM, Blay MT, Vilà R, López-Martí J, Fernández-López JA, Remesar X, Alemany M. Daily oral oleoyl-estrone gavage induces a dose-dependent loss of fat in Wistar rats. *Obes Res* 2001; 9: 202-209.

Grohmann M, Sabin M, Holly J, Crowne E, Stewart C. Characterization of differentiated subcutaneous and visceral adipose tissue from children: the influences of TNF- $\alpha$  and IGF-I. *J Lipid Res* 2005; 46: 93-103.

Her PA, Hammond RP, Homolsky MW. Sodium pump activity during norepinephrine-stimulated respiration in brown adipocytes. *Am J Physiol* 1973; 224: 1300-1304.

Petruschke Th, Hauner H. Tumour necrosis factor- $\alpha$  prevents the differentiation of human adipocyte precursor cells and causes delipidation of newly developed fat cells. *J Clin End Metab* 1993; 76: 742-747.

Remesar X, Fernández-López JA, Blay MT, Savall P, Salas A, Díaz-Silva M, Esteve M, Grasa MM, Alemany M. Effect of oral oleoyl-estrone on adipose tissue composition in male rats. *Int J Obes* 2002; 26: 1092-1102.

Remesar X, Fernández-López JA, Blay MT, Savall P, Salas A, Díaz-Silva M, Esteve M, Grasa MM, Alemany M. Effect of oleoyl-estrone on adipose tissue composition in male rats. *Int J Obes* 2002; 26: 1092-1102.

Salas A, Esteve M, Remesar X, Alemany M. Oleoyl-estrone induces apoptosis in different locations of rat white adipose tissue (Abstract). *Int J Obes* 2004; 28, suppl. 1: S103.

Salas A, Esteve M, Grasa MM, Remesar X. Rats treated with oleoyl-estrone maintain glucidic homeostasis: comparisons with a pair-fed model. *Br J Nutr* 2005; 94: 738-745.

Sanchis D, Balada F, Grasa MM, Virgili J, Peinado J, Monserrat C, Fernández-López JA, Remesar X, Alemany M. Oleoyl-estrone induces the loss of body fat in rats. *Int J Obes* 1996; 20: 588-594.

Semple RS, Chatterjee KK, O'Rahilly S. PPAR $\gamma$  and human metabolic disease. *J Clin Invest* 2006; 116: 581-589.

Trayhurn P, Wood IS. Adipokines: inflammation and pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr* 2004; 92: 347-355.

Wajchenberg BL. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to metabolic syndrome. *End Rev* 2000; 21: 697-738.

Zhang B, Berger J, Hu E, Szalkowski D, White-Carrington S, Spiegelman BM, Moller DE. Negative regulation of PPAR $\gamma$  gene expression contributes to the antiadipogenic effects of TNF $\alpha$ . *Mol Endocrinol* 1996; 10: 1457-1466.

#### ***4. El Tractament amb Oleat d'Estrona Activa Mecanismes Apoptòtics en Teixit Adipós Blanc***

---

A. Salas, X. Remesar and M. Esteve. Oleoyl-estrone treatment activates apoptotic mechanisms in white adipose tissue. Life Sciences (in press)



## INTRODUCCIÓ

L'administració experimental d'oleat d'estrona (OE) indueix la pèrdua de greix corporal, sense alterar gairebé la proteïna corporal (Sanchis i col, 1996; Grasa i col, 2001). L'OE s'ha proposat com un senyal lipostàtic que regula la massa grassa de l'organisme (Fernandez-Real i col, 1999), donat que és sintetitzat per les cèl·lules adiposes a partir d'estrona (Esteve i col, 2001) i s'allibera després a circulació sanguínia. Els efectes de l'OE en el pes corporal i la ingesta de les rates és ràpid, assolint el màxim a les 48 hores de tractament. El tractament indueix una reducció de la ingesta que inicialment és paral·lela a una baixada del pes corporal i una reducció selectiva del contingut lipídic en diferents localitzacions (Remesar i col, 2002).

Actualment, el mecanisme responsable de l'acció de l'OE es manté encara desconegut. S'ha proposat la implicació de receptors diferents dels clàssics receptors d'estrògens (Cabot i col, 2001). La notable reducció del contingut lipídic ha d'implicar probablement un procés lipolític net, tot i que les concentracions de metabòlits plasmàtics alliberats per la lipòlisi després del tractament amb OE no experimenten grans variacions; no obstant, aquests procés inclou altres vies diferents a les activades per la simple restricció de la ingesta, (Salsa i col, 2005). D'altra banda, la mobilització dels lípids i la destrucció del teixit adipós han d'estar mediatitzats per mort cel·lular programada o per algun altre mecanisme, encara no identificat. L'apoptosi podria explicar els dràstics canvis observats en el teixit adipós, ja que els complexos processos que hi estan involucrats s'han descrit en diversos teixits, sent el teixit adipós un d'ells (Sorinky i col, 2000). La reducció del contingut de DNA en algunes localitzacions en rates tractades amb OE pot ser considerada un clar indicador d'apoptosi (Remesar i col, 2002; Salas i col, 2005). A més, la reducció de l'expressió de l'àcid gras sintasa en teixit adipós blanc, juntament amb la sobre-expressió de  $TNF\alpha$  (resultats no publicats), indiquen un desequilibri entre vies anabòliques i catabòliques i està d'acord amb l'activació de mecanismes apoptòtics que podrien estar induïts per  $TNF\alpha$  (Petruschke i Hauner, 1993; Prins i col, 1997)

Aquest estudi, vol determinar la implicació dels mecanismes apoptòtics com a conseqüència de l'acció de l'OE mitjançant de l'anàlisi de la presència de fragmentació de DNA característica de l'apoptosi (Arends i col, 1990) (la mesura de les bandes de prop de 200pb) juntament amb canvis en l'expressió de gens relacionats amb l'apoptosi: Bad, Bax, Bcl-2, Bcl-xL, Bid, caspasa 3, caspasa 8 i caspasa 9.

## RESULTATS

La figura 1 mostra els canvis d'intensitat dels productes de 220 pb d'amplificació específica de fragments internucleosomals de DNA per LM-PCR. Es va triar aquesta banda després de comprovar la seva amplificació lineal a 30 cicles. Tot i que les intensitats de les bandes van mostrar una tendència a ser superiors en les mostres dels diferents teixits adiposos obtinguts després de 6 hores de tractament, les úniques diferències significatives van ser les detectades a 48 hores en mostres de teixit adipós mesentèric.

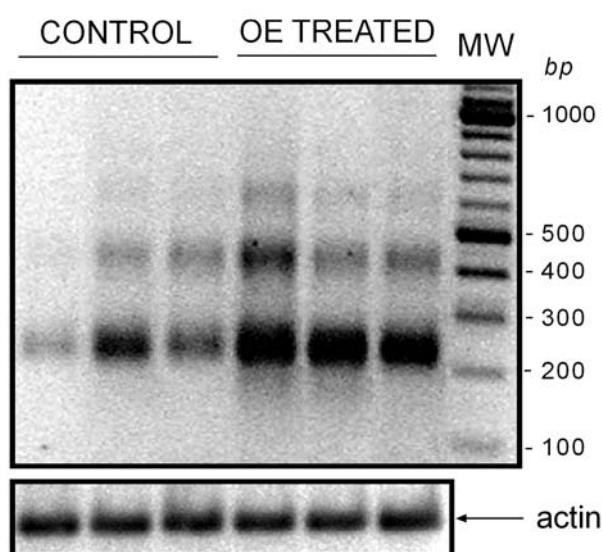


Figura 1. Evidència de la degradació internucleosomal de DNA en teixit adipós blanc de rates tractades amb OE. Gel d'electroforesi de diferents mostres de teixit adipós mesentèric: els tres carrils de l'esquerra corresponen a animals no tractats i els tres següents a animals tractats. L'últim carril de la dreta mostra el marcador de referència (marcador de pes molecular de 100 pb). Les mostres es van obtenir dels animals després de 48 hores de tractament. MW: Pes molecular

En la figura 2 es poden veure les dades de fragmentació internucleosomal de DNA en diferents mostres de teixit adipós blanc mesentèric de rates tractades amb OE durant 48 hores.

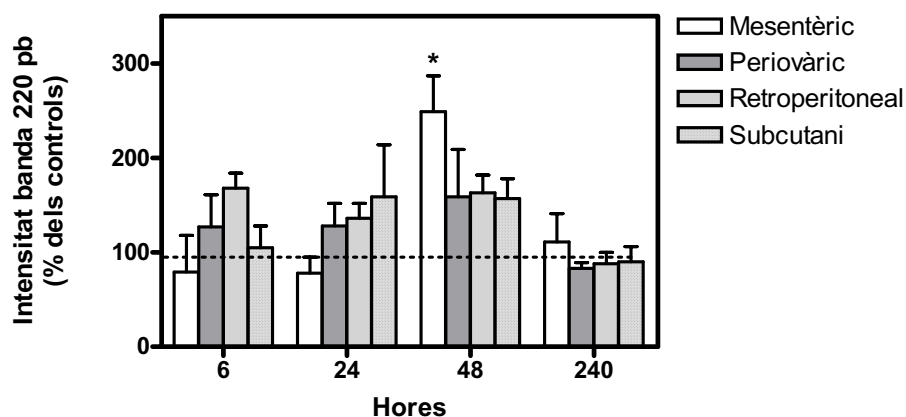


Figura 2. Canvis en la intensitat de la banda de 220 pb en el gel d'electroforesi. Els resultats es mostren com a percentatge dels valors control en diferents teixits i estan expressats com la mitjana  $\pm$  SEM. Les dades es van avaluar per test t Student desparellat. Les diferències amb P valors  $<0.05$  es van considerar significatives (\*).

La figura 3 mostra la intensitat de les bandes dels factors apoptòtics que incrementen significativament com a conseqüència del tractament amb OE durant 48 hores. Els increments més pronunciats es donen en l'expressió de Bid.

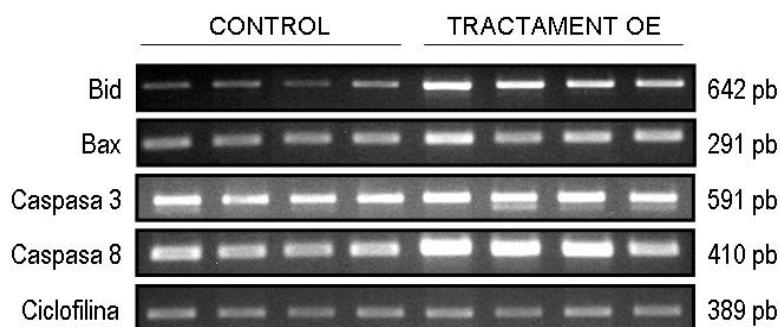


Figura 3. Imatge representativa d'un gel d'agarosa de diferents factors apoptòtics en teixit adipós mesentèric. Els quatre primers carrils corresponen a mostres diferents d'animals controls, mentre que els quatre últims corresponen a diferents mostres d'animals tractats amb OE. Es mostren els factors apoptòtics que es troben significativament sobreexpressats com a conseqüència dels tractament: Bid, Bax, caspasa3 i caspasa 8.

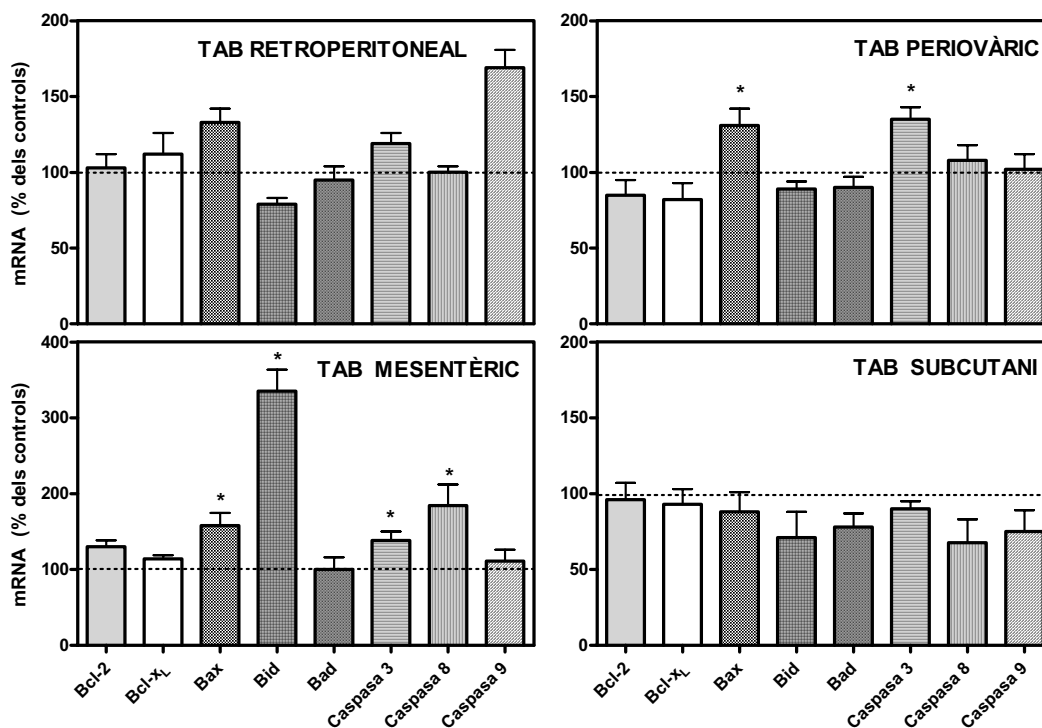


Figura 4. Canvis en l'expressió de diferents factors involucrats en la cascada apoptòtica en teixit adipós blanc després de 48 hores de tractament amb OE. Les dades es mostren com a percentatges dels valors controls en els diferents teixits i estan expressats com la mitjana ± SEM. Les dades van ser evaluades per test t Student desaparellat. Les diferències amb P valors <0.05 es van considerar significatives (\*).

A la figura 4 es troben els canvis en els nivells d'expressió d'RNAm de diferents factors involucrats en la cascada apoptòtica en teixit adipós blanc després de 48 hores de tractament amb OE. No es van veure diferències entre les mostres tractades i control ni en el teixit adipós retroperitoneal ni subcutani. En canvi, en el periovàric, es van observar un increment significatiu en l'expressió de Bax i caspasa 3. Aquests canvis també es van detectar en el teixit mesentèric alhora que una expressió incrementada de Bid i caspasa 8.

## DISCUSSIÓ

El tractament de rates amb OE a curt termini (fins a 48 hores) causa una tendència general a disminuir l'expressió d'enzims lipogènics (àcid gras sintasa i lipoproteïna lipasa) i a incrementar l'expressió de factors pro-apoptòtics tals com el  $TNF\alpha$  (resultats no publicats).

La lleu tendència a incrementar la intensitat de la banda de 220 pb de DNA en l'electroforesi observada a 6 hores és coincident amb l'inici de la mobilització lipídica. Tot i que la hipòtesi que l'eliminació d'adipòcits per apoptosi contribueixi significativament a la pèrdua de teixit adipós és relativament recent (Prins i col, 1997). No obstant, els únics



resultats estadísticament significatius observats en aquest estudi corresponen al teixit adipós mesentèric, que gaudeix d'un metabolisme molt actiu, tant en condicions basals o com a conseqüència del tractament amb OE (Remesar i col, 2002; Salas i col, 2005). La manca de resposta significativa en els teixits adiposos de les altres localitzacions poden ser interpretades com una confirmació dels diferents papers metabòlics atribuïts a les diferents localitzacions (Wajchenberg, 2000; Lanfontan i Berlan, 2003).

Donat que els efectes del tractament amb OE apareixen entre 6 i 48 hores després de l'inici del tractament, seria raonable esperar que els canvis principals apareguessin a aquest temps i no pas als 10 dies. Aquest fet confirma que els efectes de l'OE són ràpids i que els mecanismes activats han d'actuar durant les primeres 48 hores del tractament. Així també es sap que no estan causats per la restricció de la ingesta, donat que el perfil metabòlic del model restringit *pair-fed* no coincideix amb el dels animals tractats amb OE (Salas i col, 2005).

L'inici de la cascada apoptòtica (veure figura 8, pàg. 50), que pot ser considerada com una decisió entre la supervivència cel·lular i la mort, pot donar-se per dues vies principals, una d'elles implica l'activació dels receptors cel·lulars (via extrínseca) i l'altra implica l'alliberació de citocrom c de la mitocondria (via intrínseca) (Broker i col, 2005). En la via de receptors de mort cel·lular, el procés s'inicia per un estímul extern que s'uneix als receptors de membrana i acaba activant la caspasa 3 efectora, que permetrà el trencament de certs substrats metabòlics (Cohen, 1997).

En el teixit adipós mesentèric, podem assumir que la via de receptors de mort està activada, donat l'increment significatiu observat en l'expressió de la caspasa 8 (iniciadora) i la caspasa 3 (efectora).  $TNF\alpha$  podria estar implicat en aquest efecte, doncs és un potent inductor de mort cel·lular a través de receptors específics (Ashkenazi i Dixit, 1998) i s'expressa a nivells superiors en teixit adipós mesentèric en resposta al tractament amb OE (resultats no publicats). La via mitocondrial es troba gairebé segur induïda en teixit adipós mesentèric, donat l'increment de l'expressió de Bax i Bid, membres pro-apoptòtics de la família de Bcl-2 (Jakoby, 2004), que desplacen l'equilibri cap a una translocació mitocondrial (Desagher i Martinou, 2000). El balanç entre proteïnes mitocondrials de la família de Bcl-2 anti i proapoptòtiques determinen la decisió de la cèl·lula per la supervivència o la mort regulant l'alliberació de citocrom c per la mitocondria. L'activació de la caspasa 8 i la seva acció sobre Bid faciliten que Bax simuli l'alliberació de citocrom c al citoplasma (Jakoby, 2004). Aquest és un pas crucial en la inducció de la mort cel·lular apoptòtica perquè permet la formació de l'apoptosoma i la seva activació de caspases tals com caspasa 9 i la final activació de la caspasa 3. A més, l'absència de canvis en l'expressió de Bcl-2 i Bcl-xL, que poden activar com a inhibidors de la cascada apoptòtica, reforça el balanç cap a l'apoptosi.

En el teixit adipós periovàric, l'expressió de la caspasa 8 es manté igual, mentre que l'expressió de Bax i caspasa 3 incrementa, suggerint que, en contrast amb el teixit mesentèric, és la via mitocondrial la que es troba activada. Aquesta observació pot confirmar els suggeriments anteriors de que el tractament amb OE difereixen en el teixit adipós de les diferents localitzacions adiposes (Remesar i col, 2002; Salas i col, 2005). A més a més, l'absència de canvis en cap dels factors i enzims estudiats en el teixit adipós retroperitoneal i subcutani reforça el suggeriment que el teixit adipós té diferències de susceptibilitats als estímuls apoptòtics d'acord amb la seva localització anatòmica (Niesler i col, 1998). Això és consistent amb la superior activitat metabòlica, superior activitat lipolítica i resposta adrenèrgica del adipòcits mesentèrics comparats amb els dels dipòsits subcutanis (Wajchenberg, 2000).

Les dades que aquí es presenten suggereixen que els efectes del tractament amb OE poden ser mediatitzats per apoptosi en certes localitzacions de teixit adipós, tant per l'estimulació per factors extracel·lulars com per l'activació de processos interns. No obstant, no cal oblidar que aquesta interpretació podria ser molt més complexa, donat que hi ha altres mecanismes de mort cel·lular caspasa-independents, que també podrien estar-hi involucrats (Broker i col, 2005).

## REFERÈNCIES

- Alemany, M., Fernández-López, J.A., Pietrobelli, A., Granada, M., Foz, M., Remesar, X., 2003. Pérdida de peso en un paciente con obesidad mórbida en tratamiento con oleoil-estrone. *Medicina Clínica (Barcelona)* 121, 496-499.
- Arends, M.J., Morris, R.G., Wyllie A.H., 1990. Apoptosis: the role of endonuclease. *American Journal of Pathology* 136, 593-608.
- Ashkenazi, A., Dixit, V.M., 1998. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281, 1305-1308.
- Bröker, L.E., Kruyt, F.A.E., Giaccone, G., 2005. Cell death independent of caspases: a review. *Clinical Cancer Research* 11, 3155-3162.
- Cabot, C., Grasa, M.M., Masanés, R.M., de Matteis, R., Cinti, S., Fernández-López, J.A., Remesar, X., Alemany, M., 2001. Oleoil-estrone does not have direct estrogenic effects on rats. *Life Science* 69, 749-761.
- Cohen, G.M., 1997. The caspases: the executioners of apoptosis. *Biochemical Journal* 326, 1-16.

Desagher, S., Martinou, J.C., 2000. Mitochondria as central control point of apoptosis. *Trends in Cell Biology* 10, 369-377.

Esteve, M., Savall, P., Virgili, J., Fernández-López, J.A., Remesar, X., Alemany, M., 2001. Modulation by leptin, insulin and corticosterone of oleoyl-estrone synthesis in cultured 3T3L1 cells. *Bioscience Reports* 21, 755-763.

Fernández-Real, J.M., Sanchis, D., Ricart, W., Casamitjana, R., Balada, F., Remesar, X., Alemany, M., 1999. Plasma oestrone-fatty acid ester levels are correlated with body fat mass in humans. *Clinical Endocrinology* 50, 253-260.

Grasa, M.M., Cabot, C., Esteve, M., Yubero, P., Masanés, R.M., Blay, M.T., Vilà, R., López-Martí, J., Fernández-López, J.A., Remesar, X., Alemany, M., 2001. Daily oral oleoyl-estrone gavage induces a dose-dependent loss of fat in Wistar rats. *Obesity Research* 9, 202-209.

Jakobi, R., 2004. Subcellular targeting regulates the function of caspase-activated protein kinases in apoptosis. *Drug Research Updates* 7, 11-17.

Lafontan, M., Berlan, M., 2003. Do regional differences in adipocyte biology provide new pathophysiological insights?. *Trends in Pharmacological Sciences* 24, 276-283.

Niesler, C.U., Siddle, K., Prins, J.B., 1998. Human preadipocytes display a depot specific susceptibility to apoptosis. *Diabetes* 47, 1365-1368.

Masanés, R.M., Grasa, M.M., López-Martí, J., Díaz-Silva, M., Fernández-López, J.A., Remesar, X., Alemany, M., 2003. Zucker obese rats store less acyl-estrone than lean controls. *International Journal of Obesity* 27, 428-432.

Petruschke, T.H., Hauner, H., 1993. Tumor necrosis factor-alpha prevents the differentiation of human adipocyte precursor cells and causes delipidation of newly developed fat cells. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 76, 742-747.

Prins, J.B., Niesler, C.U., Winterford, C.M., Bright, N.A., Siddle, K., O'Rahilly, S., Walker, N.I., Cameron, D.P., 1997. Tumour necrosis factor-alpha induces apoptosis of human adipose cells. *Diabetes* 46, 1939-1944.

Remesar, X., Fernández-López, J.A., Blay, M.T., Savall, P., Salas, A., Díaz-Silva, M., Esteve, M., Grasa, M.M., Alemany, M., 2002. Effect of oral oleoyl-estrone on adipose tissue composition in male rats. *International Journal of Obesity* 26, 1092-1102.

Salas, A., Esteve, M., Grasa, M.M., Remesar, X., 2005. Rats treated with oleoyl-estrone maintain glucidic homeostasis: comparisons with a pair-fed model. *British Journal of Nutrition* 94, 738-745.

Sanchis, D,, Balada, F,, Grasa, M,M,, Virgili, J,, Peinado, J,, Monserrat, C,, Fernández-López, J,A,, Remesar, X,, Alemany, M., 1996. Oleoyl-estrone induces the loss of body fat in rats. *International Journal of Obesity* 20, 588-594.

Shimatsu, A., Rotwein, P., 1987. Mosaic evolution of the insulin-like growth factors. Organization, sequence, and expression of the rat insulin-like growth factor I gene. *Journal of Biological Chemistry* 262, 7894-7900.

Sorisky, A., Magun, R., Gagnon, A.M., 2000. Adipose cell apoptosis: death in the energy depot. *International Journal of Obesity* 24, Suppl. 4, S3-S7

Staley, K., Blaschke, A.J., Chun. J., 1997. Apoptotic DNA fragmentation is detected by a semi-quantitative ligation-mediated PCR of blunt DNA ends. *Cell Death Differentiation* 4, 66-75.

Trayhurn, P., Wood, I.S., 2004. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *British Journal of Nutrition*. 92, 347-355.

Wajchenberg, B.L. 2000. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to metabolic syndrome. *Endocrine Reviews* 21, 697-738.

## ***5. El Tractament a Curt Termini amb Oleat d'Estrona Afecta Profundament la Mobilització i Deposició de Lípids en Teixit Adipós***

---

A. Salas, V. Noé, C.J. Ciudad, MM. Romero, X. Remesar and M. Esteve. Short-term Oleoyl-estrone treatment affects deeply the rat's capacity to manage lipids in adipose tissue. Treball enviat a la revista British Journal of Nutrition (Juliol 2006)



## INTRODUCCIÓ

L'administració experimental d'oleat d'estrone (OE) indueix selectivament la pèrdua de greix corporal, sense la corresponent pèrdua de proteïna corporal (Sanchis i col, 1996; Grasa i col, 2001). Donat que l'OE és sintetitzat per les cèl·lules adiposes a partir d'estrone (Esteve i col, 2001) i s'allibera després a circulació sanguínia, on la seva concentració està correlacionada amb la massa grassa corporal (Fernandez-Real i col, 1999; Cabot i col, 2000). Aquest compost s'ha proposat com un senyal lipostàtic que regula la massa grassa de l'organisme. Els efectes a curt termini del tractament amb OE en rates produeixen una reducció de la ingesta, una reducció del pes corporal i una reducció dràstica dels nivells de colesterol, principalment degut a una baixada dels nivells de colesterol HDL que causa una taxa de recanvi de colesterol incrementada (Cabot i col, 2005). Aquest patró s'ha reproduït també en humans obesos (Alemany i col, 2003). La caiguda selectiva del contingut lipídic és una conseqüència directa de la reducció generalitzada de la massa de teixit adipós en diverses localitzacions corporal (Remesar i col, 2003).

La administració intravenosa de dosis farmacològiques d'oleat d'estrone causen efectes estrogènics lleus, i provoquen uns nivells d'estrone circulants alts (Cabot i col, 2001). L'administració oral de l'ester d'estrone, no obstant, evita aquests efectes mantenint els nivells baixos tant d'estrone com d'estradiol. A més, el tractament oral amb OE no incrementa el contingut corporal total d'estrògens en la rata (Masanés i col, 2003). La manca de notables efectes estrogènics ha estat confirmada quan un home obès s'ha sotmès al tractament amb OE per perdre pes sense patir efectes secundaris (Alemany i col, 2003). Fins ara, el mecanisme d'acció de l'OE roman encara desconegut. Així, s'ha proposat la implicació de receptors diferents dels receptors d'estrògens clàssic (Cabot i col, 2001), tot i que sembla que el mecanisme responsable implica vies diferents de les activades únicament per la restricció energètica (Salas i col, 2005).

Sembla evident, no obstant, que l'acció de l'OE ha d'estar relacionada amb la capacitat del teixit adipós blanc de gestionar els compostos lipídics. Per aquesta raó, l'objectiu d'aquest treball va ser determinar si el tractament a curt termini amb OE, a més dels seus efectes sobre la ingesta, causava canvis significatius en l'expressió de gens reguladors del metabolisme lipídic en teixit adipós blanc.

## RESULTATS

Rates Wistar van ser sotmeses a un tractament oral amb OE. Després de 48 hores, es va determinar el seu pes corporal i la ingesta a més dels nivells de diferents metabòlits en sèrum (Taula 1). Els animals tractats van mostrar percentatges de pes corporal inferiors als

controls, juntament amb una notable reducció de la ingesta. Els nivells plasmàtics dels metabòlits no van mostrar canvis importants en els animals tractats, tret del colesterol HDL que va experimentar una reducció significativa comparat amb els controls.

Taula 3. Canvi de pes, ingesta i paràmetres plasmàtics de rates Wistar després de 48 hores de tractament amb OE.

Paràmetre	Unitats	Control		OE	
		Mitjana	SEM	Mitjana	SEM
Pes corporal	% inicial	101 ± 0.89		96.8 ± 0.76*	
Ingesta acumulada	g	42.9 ± 2.1		29.7 ± 2.6*	
Glucosa	mM	7.72 ± 0.20		7.65 ± 0.31	
Colesterol total	mM	1.48 ± 0.13		0.88 ± 0.04*	
Colesterol HDL	mM	0.98 ± 0.14		0.22 ± 0.02*	
Quocient colesterol total/HDL	%	66.2 ± 7.2		23.7 ± 2.05*	
Àcids grassos lliures	mM	0.56 ± 0.08		0.60 ± 0.04	
3-hidroxiacetilcolina	mM	0.28 ± 0.02		0.30 ± 0.06	
Triacilglicerols	mM	0.91 ± 0.09		0.79 ± 0.10	

Les dades mostrades són les mitjanes amb l'error estandar de sis animals per grup. Les comparacions estadístiques entre grups s'han determinat pel test t Student. \*P<0.05

Es va analitzar un perfil d'expressió de 1186 gens inclosos en l'Atlas Rat Array 1.2 (BD) en el teixit adipós blanc mesentèric d'animals controls i tractats amb OE. El tractament amb OE va reduir l'expressió de 232 gens i va incrementar la de 75 gens en el teixit adipós mesentèric. La taula 2 mostra 18 gens infraexpressats i 7 sobreexpressats seleccionats que tenen una relació tractat/control (*ratio*) inferior de 0.5 o superior a 1.5 comparats amb el grup control de teixit adipós blanc mesentèric. L'àcid gras sintasa (FAS), l'acetil CoA carboxilasa, la proteïna d'unió a àcids grassos d'adipòcit (FABP4), la lipoproteïna lipasa (LPL), la carnitina palmitoil-transferasa 1b (CPT1b), la lipasa sensible a les hormones (HSL) i la proteïna transportadora d'àcids grassos 1 (FATP1) mostren *ratio* inferiors a 0.4. Els gens diferencialment expressats es van classificar d'acord amb la seva funció en diverses categories en funció del seu paper en el metabolisme lipídic complex, el metabolisme lipídic simple, altres proteïnes de senyalització, etc.

Després varem validar l'expressió diferencial d'alguns gens específics per verificar els canvis en els nivells d'mRNA. La PCR en temps real ofereix una detecció no basada en la hibridació que va ser triada com a tècnica complementària als arrays.

Els gens seleccionats van ser analitzats per PCR en temps real sota les mateixes condicions experimentals que els arrays.



Taula 2. Gens que es troben diferencialment expressats en TAB mesentèric de rates tractades amb OE durant 48 hores.

<b>Gens infraexpressats</b>	<b>Ratio</b>	<b>GeneBank</b>	<b>Classificació funcional</b>
Fatty acid synthase (FAS)	0.11	M76767	Metabolisme de cofactors, vitamines i substàncies relacionades
Acetyl-CoA carboxylase (ACC)	0.19	J03808	Metabolisme lipídic simple
Prostaglandin d2 receptor	0.30	U92289	Receptors hormonaals
Fatty acid transport protein (FATP1)	0.31	U89529	Altres canals de membrana i transportadors
Very long chain acyl-coa dehydrogenase (vicad)	0.32	D30647	Metabolisme de cofactors, vitamines i substàncies relacionades
Lipoprotein lipase (LPL)	0.33	L03294	Metabolisme lipídic complex
Slow voltage-gated potassium channel protein	0.33	M22412	Canals iònics dependents de voltatge
Low density lipoprotein receptor	0.35	X13722	Altres receptors
Pyruvate dehydrogenase kinase	0.37	L22294	Membres de la xarxa de cinases intracel·lulars
Adipocyte fatty acid-binding protein (FABP4)	0.38	U75581	Altres proteïnes de tràfic i senyalització
Camitine palmitoyltransferase 1b (CPT1b)	0.39	D43632	Metabolisme lipídic simple
Hormone-sensitive lipase (HSL)	0.40	U40001	Metabolisme lipídic simple
Cytochrome P450 2c7	0.42	M18335	Metabolisme lipídic complex
Glucose-6-P-dehydrogenase	0.45	X07467	Metabolism complexe dels carbohidrats
Retinoid X receptor beta	0.45	M81766	Receptors nuclears
Brain fatty acid binding protein	0.45	U02096	Altres proteïnes de tràfic i senyalització
Adenyl cyclase	0.46	M80633	Ciclaes i Diesterases Adenilat/Guanilat
Proteasome 26s subunit 2	0.47	D50694	Proteïnes proteosomals
<b>Gens sobreexpressats</b>	<b>Ratio</b>	<b>GeneBank</b>	<b>Classificació funcional</b>
Insulin receptor-related receptor alpha subunit	1.52	M90661	Membres de la xarxa de cinases intracel·lulars
Cytochrome p450 4f5	1.72	U39207	Metabolisme lipídic complex
Tumor necrosis factor alpha (TNFα)	1.77	X66539	Factors de creixement, Citocines i quimiocines
GTP-binding protein	1.82	L19699	Proteïnes G
Ras-gtpase activation protein	1.85	L13151	Bescanviadors de GTP/GDP i moduladors de l'activitat GTPasa
Cytochrome p450 4b1	2.01	M29853	Altres enzims metabòlics
Protein arginine n-methyltransferase 1	3.59	U60882	Adaptors intracel·lulars i Proteïnes associades a receptors

Es va determinar que en teixit adipós mesentèric els valors d'mRNA de l'HSL es troben reduïts en un 32%, mentre que els de FAS, ACC i CPT1b es ho fan en un 95%, un 92% i un 45% respectivament amb el tractament amb OE. En la figura 2 es pot veure com el tractament amb OE redueix l'expressió de l'mRNA de FATP1 amb un 52%, la FABP4 amb un 49% i la LPL un 52%. D'altra banda, TNF $\alpha$  es troba sobreexpressat (198%) com a conseqüència del tractament amb OE.

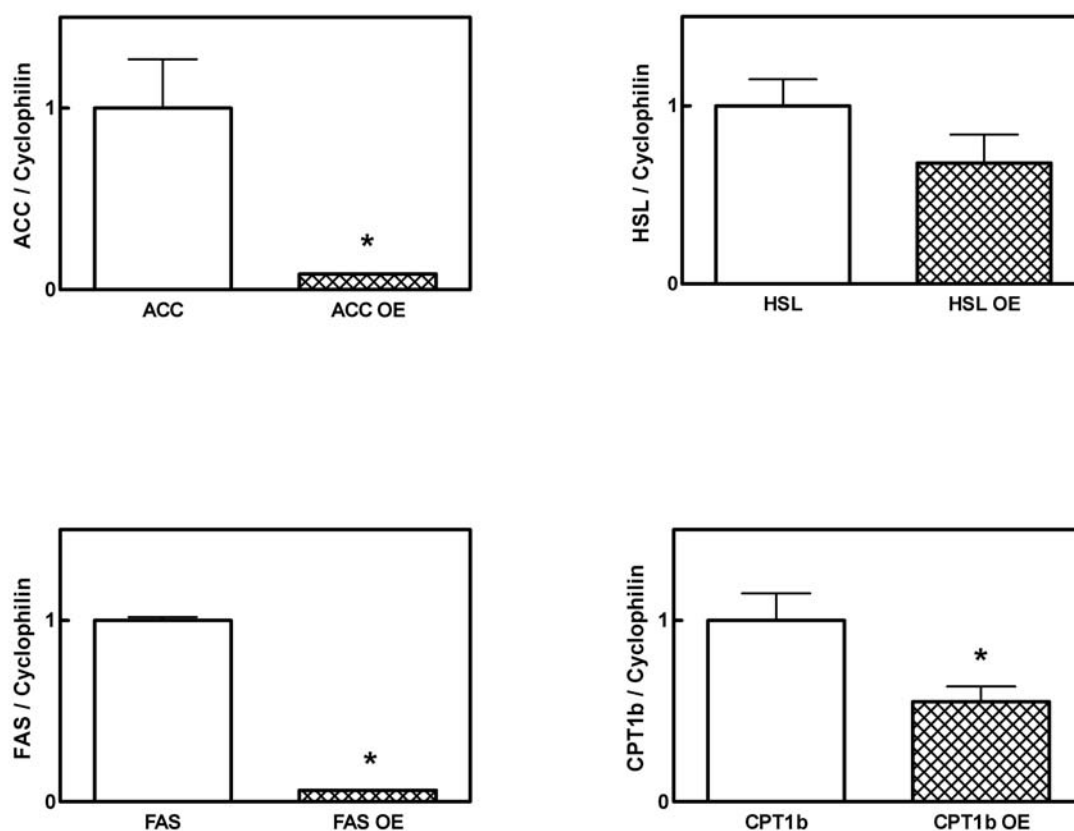


Figura 1. Quantificació de l'expressió de l'ACC, HSL, FAS i CPT1b per PCR en temps real en mostres de teixit adipós blanc mesentèric de rates tractades durant 48 amb OE. Els resultats expressen nivells d'RNAm, corregits pels valors de l'expressió de ciclofilina i expressats com a percentage dels controls. Les dades es representen com la mitjana  $\pm$  SEM de 4 experiments diferents. Els asteriscs indiquen diferències respecte dels controls: \*P< 0.05.

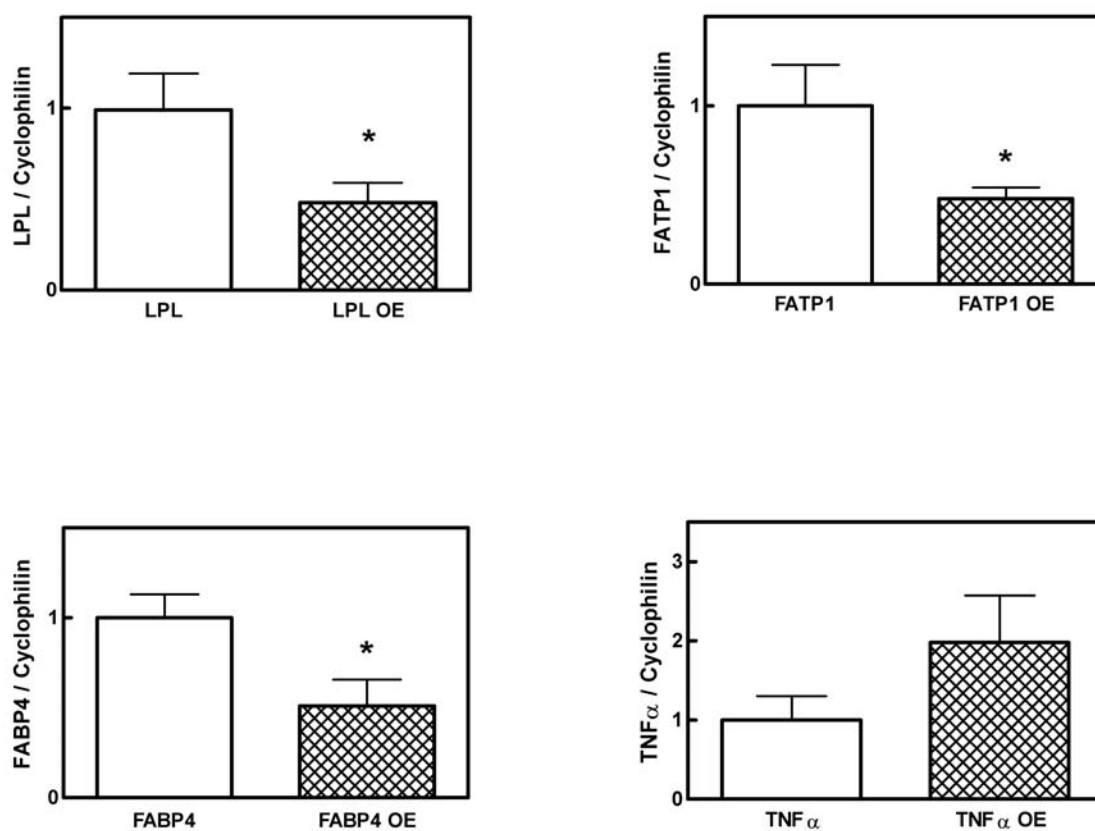


Figura 2. Quantificació de l'expressió de l'LPL, la FATP1, la FABP4 i TNF $\alpha$  per PCR en temps real en mostres de teixit adipós blanc mesentèric de rates tractades durant 48 amb OE. Els resultats expressen nivells d'RNA, corregits pels valors de l'expressió de ciclofilina i expressats com a percentatge dels controls. Les dades es representen com la mitjana  $\pm$  SEM de 4 experiments diferents. Els asteriscs indiquen diferències respecte dels controls: \*P < 0.05.

En teixit adipós mesentèric, es va determinar que els valors d'mRNA de l'HSL es va reduir en un 32%, mentre que els de FAS, ACC i CPT1b es van reduir en un 95%, un 92% i un 45% respectivament amb el tractament amb OE. En la figura 2 es pot veure com el tractament amb OE redueix l'expressió de l'mRNA de FATP1 amb un 52%, la FABP4 amb un 49% i la LPL un 52%. D'altra banda, TNF $\alpha$  es trobava sobreexpressat (198%) com a conseqüència del tractament amb OE.

Tots aquests canvis van resultar ser estadísticament significatius ( $p < 0.05$ ), excepte per la HSL i TNF $\alpha$ . Aquests resultats van confirmar les dades d'RNA obtingudes amb l'"*screening*" dut a terme per la tècnica del arrays de cDNA.

## DISCUSSIÓ

El tractament a curt termini amb OE va reproduir el mateix patró descrit anteriorment (Cabot i col, 2005), on la reducció de la ingesta i els nivells de colesterol HDL van ser els principals afectats. Amb aquestes condicions estendards, varem poder determinar el perfil d'expressió gènica en les mostres de teixits extrems dels animals tractats amb OE i confirmar per PCR en temps real els canvis en l'expressió d'alguns gens específics. En el teixit adipós mesentèric es van seleccionar diferents enzims implicats tant en l'emmagatzematge com en la mobilització de lípids; la LPL com a principal responsable de la captació d'àcids grassos provinents de lipoproteïnes; la FATP1 i FABP4 implicats en el transport d'àcids grassos a través de la membrana i el citosol respectivament; la ACC i la FAS com a enzims reguladors de la síntesi d'àcids grassos; la HSL com a principal responsable de la mobilització de triglicèrids i la CPT1b com a via de regulació de la beta-oxidació. A més, també es va seleccionar un pèptid regulador,  $TNF\alpha$ , que té un paper important en el control de la proliferació del teixit i la captació i emmagatzematge de metabòlits.

La LPL és l'enzim clau de la hidròlisi de les lipoproteïnes circulants (en QM i VLDL) a àcids grassos lliures i glicerol i juga un paper molt rellevant en la deposició de reserves lipídiques de l'adipòcit i per tant en la regulació de l'obesitat (Mayes i Watson, 2004). S'ha proposat que la LPL actuï com porta d'entrada per la captació d'àcids grassos als teixits (Greenwood, 1985), malgrat que altres vies hi estiguin implicades, doncs tant els humans com els ratolins sense LPL en teixit adipós, encara tenen alguns àcids grassos essencials en teixit adipós (Merkel i col, 2002). La reducció de l'expressió produïda pel tractament amb OE és consistent amb la reducció de pes descrita prèviament, que alhora és una conseqüència de la reducció del pes del teixit adipós (Remesar i col, 2002). Així, si el teixit adipós ha perdut capacitat d'extreure lípids de les lipoproteïnes circulants, una reducció en l'acumulació de lípids en serà la conseqüència immediata. L'acció inhibidora dels estrògens en la LPL ja s'havia descrit anteriorment per explicar la inhibició del desenvolupament de la obesitat en la teràpia de substitució d'estrògens en rates (Mayes i Watson, 2004); no obstant, no tenim cap evidència que recolzi una acció similar pels efectes inhibitoris del tractament amb OE. A més, la reducció de l'expressió de LPL podria estar influenciada per la sobreexpressió que experimenta  $TNF\alpha$  (Morin i col, 1995) degut a la seva acció inhibidora sobre l'expressió de LPL.

L'expressió reduïda de la proteïnes de transport d'àcids grassos (FATP1 i FABP4) confirmen la idea anterior, així una baixa capacitat per alliberar àcids grassos de les lipoproteïnes es completa amb un transport reduït dins la cèl·lula (infraexpressió de FATP1), que està d'acord amb l'augment de la seva expressió i l'aparició d'obesitat (Bower i col,

2005). A més, la reducció de FABP4 recolza la baixa utilització de lípids, i podria ser una conseqüència de la baixada de la ingesta, ja que segons sembla, la FABP4 està regulada per la dieta (Damcott i col, 2004).

La lipogènesi implica la síntesi d'àcids grassos a partir de substrats no lipídics i succeeix habitualment en el fetge i el teixit adipós sota el control d'hormones i metabòlits de la dieta. Així doncs, la insulina i la glucosa activen la via lipogènica, i per contra, el glucagó i els àcids grassos poliinsaturats l'inhibeixen (Large i col, 2004). Aquestes accions reguladores poden implicar l'acció de diferents factors de transcripció i receptors nuclears, malgrat les notables diferències entre els teixits adiposos d'humans i rosegadors (Letexier i col, 2004). L'activitat de la FAS i l'expressió del seu mRNA s'utilitzen com a marcadors de lipogènesi (Wang i col, 2004), tot i que els canvis en l'activitat són principalment deguts a diferents taxes de transcripció. Una reducció dràstica en l'expressió de la FAS, tal i com succeeix amb les rates tractades amb OE, implicarà una reducció important de la seva activitat, i per tant, una disminució de la síntesi d'àcids grassos *de novo* en teixit adipós blanc. A més, la reducció en la expressió d'ACC podria reforçar la disminució de la via de síntesi d'àcids grassos.

La reducció de la capacitat de metabolitzar àcids grassos pot ser una conseqüència tant de la menor de la capacitat del teixit adipós per degradar triacilglicerols com de la reducció de la via de la beta-oxidació. Així doncs, una clara infraexpressió de l'HSL, com que la seva activitat regula la via lipolítica (Hauner i col, 1995), s'ha d'interpretar com una reducció de la capacitat de degradació de triacilglicèrids depenent d'hormones. A més, el pas dels àcids grassos a la mitocòndria es troba compromès ja que l'expressió de la CPT1b mostra uns nivells d'expressió disminuïts. Donat que la CPT1b és la isoforma present en teixit adipós (Esser i col, 1996) que regula l'entrada a la via oxidativa, tot i la baixa activitat atribuïda al teixit adipós blanc (Rossmeisl i col, 2004), la reducció de la seva expressió reforça la tendència general a mostrar una taxa d'oxidació d'àcids grassos menor com a conseqüència del tractament amb OE. A més, aquesta baixada en la activitat pot estar reforçada per la inhibició causada pel manolil-CoA acumulat com a conseqüència de la reducció de l'expressió de FAS.

TNF $\alpha$  pot actuar tant a nivell autocrí com paracrí, jugant un paper clau en el control de la producció de citocines o proteïnes de fase aguda (Coppack, 2001). La síntesi de TNF $\alpha$  en teixit adipós es dona en l'estroma vascular i en la fracció de matriu incloent els macròfags. Juga un paper fonamental en l'estat inflamatori que és característic de l'obesitat, i un increment dels seus nivells pot estar relacionat amb l'efecte inhibitor sobre la via de senyalització del receptor d'insulina, la reducció dels dipòsits de triacilglicerols en teixit adipós o en el desenvolupament de l'apoptosi (Coppack, 2001). Així doncs, la

sobreeexpressió de  $TNF\alpha$  causada pel tractament, podria activar diferents mecanismes potenciant la reducció dels dipòsits lipídics del teixit adipós blanc, inhibint l'acció de la insulina i promovent fenòmens apoptòtics, malgrat la seva incapacitat per incrementar l'expressió de l'HSL. Així el tractament amb OE indueix un increment en l'expressió de  $TNF\alpha$  que pot col·laborar al procés global de mobilització lipídica, probablement a través de l'estimulació de les vies apoptòtiques, ja que s'han descrit increments generalitzats en els marcadors d'apoptosi com a conseqüència del tractament amb OE (Salas i col, resultats no publicats)

A mode de resum, de les dades obtingudes mitjançant els arrays de cDNA hem comprovat per real-time PCR que el tractament a curt termini amb OE afecta la capacitat del teixit adipós per extreure àcids grassos de les lipoproteïnes (reducció de l'expressió de LPL), per transportar àcids grassos (reducció de FABP4 i FATP1), per generar àcids grassos de nova síntesi (baixada de l'ACC i FAS) i en la mobilització de reserves lipídiques i oxidació dels àcids grassos (reducció expressió d'HSL i CPT1b), estant el procés global controlat per factors reguladors com  $TNF\alpha$ . Aquesta ineficiència per obtenir metabòlits de la dieta, i la baixa capacitat d'emmagatzemar-los en teixit adipós ens porta al punt inicial per establir el mecanisme d'acció de l'OE.

## REFERÈNCIES

Alemany M, Fernández-López, JA, Pietrobelli A, Granada M, Foz M & Remesar X (2003) Pérdida de peso en un paciente con obesidad mórbida en tratamiento con oleoil-estrone. *Med Clin (Barcelona)* 121, 496-499.

Bower JF, Davis JM, Hao E & Barakat HA (2005) Differences in transport of fatty acids and expression of fatty acid transporting proteins in adipose tissue of obese black and white women. *Am J Physiol* 290, E87-E91.

Cabot C, Grasa MM, Masanés RM, de Matteis R, Cinti S, Fernández-López JA, Remesar X & Alemany M (2001) Oleoyl-estrone does not have direct estrogenic effects on rats. *Life Sci* 69, 749-761.

Cabot C, Masanés R, Bulló M, García-Lorda P, Fernández-López JA, Salas-Salvadó J & Alemany M (2000) Plasma acyl-estrone levels are altered in obese women. *Endocr Res* 26, 465-476.

Cabot C, Salas A, Ferrer-Lorente R, Savall P, Remesar X, Fernández-López JA, Esteve M & Alemany M (2005) Short-term oral oleoyl-estrone treatment increases plasma cholesterol turnover in the rat. *Int J Obes* 29, 534-539.

Coppack SW (2001) Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue. *Proc Nutr Soc* 60, 349-356.

Damcott CM, Moffett SP, Feingold E, Barmada MM, Marshal JA, Hamman RF & Ferrell RE (2004) Genetic variation in fatty acid-binding protein 4 and peroxisome proliferators-activated receptor  $\gamma$  interactively influence insulin sensitivity and body composition in males. *Metabolism* 53, 303-309.

Esser V, Brown NF, Cowan AT, Foster DW & McGarry JD (1996) Expression of a isolated cDNA isolated from rat brown adipose tissue and heart identifies the product as the muscle isoform of the carnitine palmitoyltransferase 1 (M-CPT1): M-CPT1 is the predominant isoform expressed in both white (epididymal) and brown adipocytes. *J Biol Chem* 271, 6972-6977.

Esteve M, Savall P, Virgili J, Fernández-López JA, Remesar & Alemany M (2001) Modulation by leptin, insulin and corticosterone of oleoyl-estrone synthesis in cultured 3T3L1 cells. *Biosci Rep* 21, 755-763.

Fernández-Real JM, Sanchis D, Ricart W, Casamitjana R, Balada F, Remesar X & Alemany M (1999) Plasma oestrone-fatty acid ester levels are correlated with body fat mass in humans. *Clin Endocrinol* 50, 253-260.

Grasa MM, Cabot C, Esteve M, Yubero P, Masanés RM, Blay MT, Vilà R, López-Martí J, Fernández-López JA, Remesar X & Alemany M (2001) Daily oral oleoyl-estrone gavage induces a dose-dependent loss of fat in Wistar rats. *Obes Res* 9, 202-209.

Greenwood MRC (1985) The relationships of enzyme activity to feeding behaviour in rats: Lipoprotein lipase as a the metabolig gatekeeper. *Int J Obes* 9, 67-70.

Hainline BE, Kahlenbeck DJ, Grant J & Strauss AW (1993) Tissue specific and developmental expression of rat long-and medium-chain acyl-CoA dehydrogenases. *Biochim Biophys Acta* 1216, 460-468.

Hauer H, Petruschke T, RussM, Rohring K & Eckel J (1995) Effect of tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) on glucose transport and lipid metabolism of newly-differentiated human cell culture. *Diabetologia* 38, 764-771.

Large V, Peroni O, Letexier D, Ray H & Beylot M (2004) Metabolism of lipids in human white adipocyte. *Diabetes Metab* 30, 294-309.

Letexier D, Pinteaur C, Large V, Fréring V & Beylot M (2004) Comparison of the expression and activity of the lipogenic pathway in human and rat adipose tissue. *J Lipid Res* 44, 2127-2134.

Masanés RM, Grasa MM, López-Martí J, Díaz-Silva M, Fernández-López JA, Remesar X & Alemany M (2003) Zucker obese rats store less acyl-estrone than lean controls. *Int J Obes* 27,428-432.

Mayes JS & Watson GH (2004) Direct effects of sex steroid hormones on adipose tissues and obesity. *Obesity Rev* 5, 197-216.

Merkel M, Eckel RH & Goldberg IJ (2002) Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake and regulation. *J Lipid Res* 43, 1997-2006

Morin CL, Schlaepfer IR & Eckel RH (1995) Tumor necrosis factor-alpha eliminates binding of NF-Y and an octamer binding protein to the lipoprotein lipase promoter in 3T3L1 adipocytes. *J Clin Invest* 95,1684-1689

Rossmesl M, Flachs P, Brauner P; Sponarova J, Matejkova O, Prazak T, Ruzikova J, Bardova K, Kuda O & Kopecky J (2004) Role of energy charge and AMP-activated protein kinase in adipocytes in the control of body fat stores. *Int J Obes* (2004) 28, S38-S44

Remesar X, Fernández-López JA, Blay MT, Savall P, Salas A, Díaz-Silva M, Esteve M, Grasa MM & Alemany M (2002) Effect of oral oleoyl-estrone on adipose tissue composition in male rats. *Int J Obes* 26, 1092-1102.

Salas A, Esteve M, Grasa MM & Remesar X (2005) Rats treated with oleoyl-estrone maintain glucidic homeostasis: comparisons with a pair-fed model. *Br J Nutr* 94, 738-746.

Sanchis D, Balada F, Grasa MM, Virgili J, Peinado J, Monserrat C, Fernández-López JA, Remesar X & Alemany M (1996) Oleoyl-estrone induces the loss of body fat in rats. *Int J Obes* 20, 588-594.

Wang Y, Voy BJ, Urs S et al. (2004) The human fatty acid synthase gene and de novo lipogenesis are co-ordinately regulated in human adipose tissue. *J Nutr* 134, 1032-1038.

Wood PA (1999) Defects in mitochondrial beta-oxidation of fatty acids. *Curr Opin Lipidol* 10, 107-112.

Wu Q, Ortegon AM, Tsang B, Doege H, Feingold KR & Stahl A (2006) FATP1 is an Insulin-sensitive fatty acid transporter involved in diet-induced obesity. *Mol Cell Biol* 26, 3455-3467.

Zang Y, Wang T, Xie W, Wang-Fischer Y-L, Getty L, Han J, Corkey BE & Guo W (2005) Regulation of acetyl CoA Carboxylase and carnitine palmitoyl transferase-1 in rat adipocytes. *Obes Res* 13, 1530-1539.



## **V. DISCUSSIÓ GENERAL**



Aquest treball estudia els efectes de l'OE a dos nivells: *in vitro* i *in vivo*. Els experiments inicials es van realitzar en cèl·lules en cultiu i després es va passar a l'estudi de tractament en animals de laboratori.

En els estudis *in vitro* hem comprovat que les cèl·lules 3T3-L1 tenen una forta activitat esterasa que podria ser causada presumiblement per més d'una forma enzimàtica. Al menys una part d'aquesta activitat esterasa és inhibible per un compost organofosforat (PMSF) i per tant implica la participació de grups serina per la catàlisi i forma part de la família de les carboxilesterases o serina esterases (Aldridge WN, 1953). Aquesta activitat esterasa s'ha localitzat a les fraccions subcel·lulars corresponents a membrana plasmàtica i microsomes d'alta densitat, fracció que conté lisosomes i reticle endoplasmàtic rugós. S'han estudiat nombroses lipases que a més dels TAGs, DAGs i MAGs, també utilitzen com a substrats els esters de colesterol i en alguns casos també esters d'esteroids. D'una banda trobem la colesterol esterasa estimulable per sals biliars, amb un pH òptim neutre de la que, a més de hidrolitzar els esters de colesterol, s'ha comprovat una activitat serina esterasa sobre els esters d'esteroids. Normalment aquest enzim es troba en grànuls de secreció de cèl·lules secretores o bé associat a fraccions de membranes de grànuls de zimògens. També la HSL té una forta activitat esterasa, amb un pH òptim neutre que es localitza al citoplasma de la cèl·lula. En aquest cas també s'ha descrit activitat sobre esters de colesterol i esters d'esteroids. Finalment trobem la lipasa àcida lisosomal, amb un pH òptim àcid, de la que fins ara s'ha descrit només activitat sobre els esters de colesterol (Hui, 1996). En els tres casos aquests enzims s'inhibeixen per PMSF, i les seves estructures catalítiques no són molt diferents. Donada la ubiqüitat de l'activitat esterasa en gairebé totes les cèl·lules de mamífer, no és d'extranyar que el teixit adipós blanc contingui una esterasa capaç d'hidrolitzar l'oleat d'estrona, ja sigui específicament, o més probablement, amb un més ampli espectre de substrats. De fet, qualsevol de les esterases ja descrites podria ser responsable d'aquesta hidròlisi en teixit adipós blanc.

Els experiments de lipòlisi realitzats en el treball *in vivo*, no ens permeten concloure que l'OE no exerceixi un efecte directe sobre els receptors adrenèrgics de la cèl·lula adiposa. No obstant, les dades tampoc ens aporten cap resultat que ens pugui fer pensar que actua directament sobre aquesta via, tot i que els experiments *in vivo* ens demostren que el teixit adipós de l'animal tractat amb OE té profundament afectada la via lipogènica i mostra també una clara tendència d'afectació de la via lipolítica.

En el segon bloc d'experiments s'ha estudiat els efectes del tractament de l'OE *in vivo*, fent especial èmfasi en aquells aspectes que poden oferir-nos informació sobre com l'OE duu a terme els seus efectes.

Sabem que els efectes propis del tractament amb OE no són mera conseqüència de la restricció de la ingesta. Així, els mecanismes responsables de la reducció del pes corporal, de la reducció selectiva de massa grassa, i el manteniment de la homeòstasi glucídica conseqüència del tractament amb OE, difereixen dels implicats en una situació de dejuni o restricció energètica. De fet, podríem dir que la disminució del pes corporal que experimenten els animals tractats amb OE és el resultat d'un balanç negatiu producte d'una despesa energètica constant (Sanchis i col, 1997) que es combina amb una disminució de la ingesta energètica. Aquest desequilibri es dona principalment per la mobilització lipídica, segons es confirma amb les dades obtingudes de les diferents localitzacions del teixit adipós, per bé que també es redueix la cel·lularitat del teixit indicant-nos el predomini de mecanismes apoptòtics (Troyer i Fernandes, 1996). No oblidem però, que a diferència dels animals als que únicament s'afecta la restricció d'aliment (grup *pair-fed*), les rates tractades amb OE mobilitzen reserves lipídiques amb uns nivells de glucosa i glicogen normals, i que per tant el desequilibri energètic generat és altament selectiu. Així les reserves de glúcids es mantenen, mentre s'afecta dràsticament la reserva lipídica de l'organisme.

Aquest diferent comportament entre les rates que reben el tractament amb OE i les que només experimenten la restricció energètica ens va confirmar que l'OE duu a terme uns efectes directes sobre el metabolisme de l'animal, no limitant-se a restringir únicament la ingesta. Això no només vol dir que l'OE no produeix els efectes secundaris del dejuni sinó que implica mecanismes d'acció diferents.

Per tal d'estudiar les vies implicades en el mecanisme d'acció de l'OE s'ha estudiat quan temps després del tractament amb OE es comencen a observar els seus efectes més primerencs i quins són aquests efectes. D'aquesta manera hem sabut que el tractament amb OE provoca una reducció de la ingesta ja a partir de les tres primeres hores després d'administrar la dosi oral, mentre que a nivell metabòlic els efectes més primerencs observats es donen a les 6 hores sobre els nivells de colesterol total. La resta dels efectes a nivell metabòlic apareixen a les 24 o 48 hores de tractament. Els efectes tant ràpids sobre el metabolisme dels colesterol ens van dur a estudiar amb més profunditat del seu recanvi, donat que és un dels trets més característics del tractament. Tal i com s'esperava, el recanvi del colesterol va resultar afectat ja des de les primeres 6 hores de tractament, en què es troba fortament accelerat pel què fa al compartiment de colesterol esterificat. Tot i que el recanvi de colesterol lliure no s'afecta pel tractament amb OE, el ràpid recanvi de colesterol esterificat podria explicar els canvis primerencs en els nivells de colesterol total i colesterol HDL, implicant d'aquesta manera un ritme accelerat del metabolisme i recanvi de les lipoproteïnes.

És clar que l'OE ha de tenir efectes claus en el teixit adipós blanc, teixit que disposa de diverses estratègies per regular el seu nivell de reserves i la seva diferenciació. Per això ens va interessar saber quins d'aquests mecanismes era capaç d'activar el tractament amb OE per aconseguir una reducció selectiva de la massa grassa de l'animal, o el que és el mateix, una reducció dels pesos de les diferents localitzacions adiposes que componen el teixit adipós blanc. Així varem estudiar l'expressió d'alguns dels factors implicats en l'adipogènesi, l'apoptosi i el metabolisme lipídic del teixit adipós blanc després de 48 hores d'iniciar el tractament.

Les localitzacions retroperitoneal i periovàrica experimenten una reducció dels nivells d'expressió de  $TNF\alpha$  que impliquen una manca de l'acció inhibidora sobre la LPL i la lipogènesi, alhora que es redueix l'activació de la lipòlisi que causa  $TNF\alpha$ . No obstant, els teixits experimenten una reducció del seu pes amb el tractament de 10 dies (Remesar i col, 2002), i de fet, els nivells de  $PPAR\gamma 2$  no es veuen afectats pel tractament (com a conseqüència de la davallada de  $TNF\alpha$ ). Tot i això, en el cas de la localització periovàrica, el  $PPAR\beta$  es troba significativament augmentat, i el retroperitoneal també en mostra la tendència. Així podríem estimar que aquestes dues localitzacions adiposes utilitzen més la mobilització lipídica que no pas una alteració del ritme de diferenciació adipocitària per aconseguir reduir la seva massa. D'altra banda cal dir que amb 48 hores no es poden apreciar encara gaire canvis en el pes dels teixits adiposos, ni en la seva cel·lularitat. Únicament en el cas del teixit adipós periovàric podem apreciar ja una reducció del pes cel·lular. Aquestes dades estan d'acord amb les dades anteriorment publicades sobre la cel·lularitat dels diferents teixits adiposos, en què el periovàric i retroperitoneal experimenten una reducció entre el 13-14% del pes cel·lular (Remesar i col, 2002). En aquests experiments també s'observa però una dràstica reducció del nombre de cèl·lules del periovàric, que tot i que no es poden explicar per una desdiferenciació o inhibició de la diferenciació adipocitària, estarien justificades per l'increment dels factors apoptòtics estudiats. Així l'augment de l'expressió de Bax i caspasa 3 en aquesta localització ens porta a pensar en l'activació de fenòmens apoptòtics per la via mitocondrial o intrínseca, via en la que no intervindria  $TNF\alpha$ .

El teixit adipós que més veu afectat el seu pes cel·lular amb el tractament amb OE de 10 dies és el subcutani, teixit que en múltiples ocasions s'ha classificat com menys susceptible a una activació lipolítica i amb una taxa de recanvi més alentida que les localitzacions visceral (Lafontan i Berlan, 2003). En aquest cas, però, les dades revelen una reducció del 21% del pes cel·lular i una reducció del pes total del 23% als 10 dies de tractament. Malgrat això, a les 48 hores de tractament l'expressió de  $PPAR\beta$  es troba força reduïda, implicant doncs una reducció de l'activació de la lipòlisi per aquest factor, que

d'altra banda amb 2 dies de tractament, tampoc aconsegueix causar diferències en el pes cel·lular. Tanmateix el teixit adipós subcutani tampoc veu afectat cap dels factors apoptòtics estudiats, cosa que ens fa pensar que potser aquest teixit tingui una resposta més tardana al tractament amb OE que comenci a donar resultats passades les 48 hores d'inici del tractament.

El mesentèric és un teixit al que s'ha descrit un metabolisme actiu i amb una taxa de recanvi cel·lular molt alta. La seva potent resposta a un estímul com  $TNF\alpha$  per induir apoptosi concorda amb una major tendència a la reducció del nombre de cèl·lules més important a la reducció de la mida cel·lular als 10 dies de tractament (Remesar i col, 2002). De fet, aquest és el teixit més afectat pel que fa al pes total pel tractament de l'OE, arribant a una reducció del 39% del pes respecte dels controls. No obstant, amb 48 hores de tractament encara no es poden apreciar diferències en el pes cel·lular, tot i que ja es pot observar la reducció de l'expressió de  $PPAR\gamma 2$ , afectant doncs a la taxa de diferenciació adipocitària. D'altra banda no podem obviar que mentre la resta dels teixits adiposos experimenten una reducció o una tendència a reduir els nivells d'expressió de  $TNF\alpha$  a les 48 hores, en el cas del mesentèric la tendència s'inverteix, cosa que podria causar els efectes sobre l'expressió de  $PPAR\gamma 2$  i donar lloc a una desdiferenciació adipocitària o una inhibició de l'adipogènesi (Xu i col, 1999). D'altra banda  $TNF\alpha$  és un potent lligand dels receptors de mort cel·lular, fet que concorda amb la sobreexpressió de diversos factors proapoptòtics estudiats. L'increment de la caspasa 8 i la caspasa 3 ens indiquen una activació apoptòtica per la via extrínseca per receptors de mort cel·lular, d'acord amb l'increment de  $TNF\alpha$ . A més, l'acusada sobreexpressió de Bid juntament amb la pujada dels nivells d'expressió de Bax, indiquen també, la participació de la via mitocondrial com a conseqüència d'una translocació a partir de l'activació extrínseca, fet que amplifica la senyal apoptòtica generada. De fet això explicaria que sigui l'únic teixit adipós que presenta una fragmentació internucleosomal del DNA característic de les cèl·lules en procés apoptòtic. Així doncs, totes les dades apunten cap a una resposta acusada al tractament amb OE que condueix la cèl·lula adiposa cap a una mort cel·lular programada que podria donar-se amb la paral·lela desdiferenciació o aturada de l'adipogènesi adipocitària.

La diversa resposta de cadascuna de les localitzacions adiposes al tractament amb OE posa de manifest la heterogeneïtat de resposta i metabolisme de cada teixit, no obstant, en tots els casos la conseqüència final acaba sent la reducció del pes de la massa grassa.

Tot i la informació obtinguda fins al moment sobre els mecanismes de resposta de cadascun dels teixits adiposos, encara ens mancava saber moltes dades de les vies metabòliques implicades en aquesta resposta. Així, ens varem plantejar l'estudi d'expressió gènica del teixit adipós d'una manera més extensa, i per això varem recórrer als *arrays* de

DNA. Aquesta tècnica ens permetia fer un *screening* entre més de 1000 gens d'interès que ens facilitaríen més dades per tal d'entendre les vies implicades en el mecanisme d'acció de l'OE. Sobretot ens interessava estudiar l'estat del metabolisme lipídic a que estaven sotmeses les cèl·lules adiposes del teixit mesentèric, el teixit que més veu afectat el pes amb el tractament amb OE a 10 dies. A més també havíem observat una resposta ràpida a l'OE en aquesta localització, que ens permetria veure quina és la resposta a curt termini pel tractament, i així veure més aïlladament l'acció de l'OE.

Era prou clar que aquest teixit responia ràpidament a l'OE amb una mort cel·lular programada, però aquest teixit també acaba perdent un 8% del pes cel·lular als 10 dies (Remesar i col, 2002), fet que ens indica que hi ha una cooperació de tots dos mecanismes.

Les dades obtingudes posen de manifest que aquest teixit està sotmès a canvis profunds en el metabolisme lipídic com a conseqüència del tractament a curt termini amb OE. La principal responsable de captació d'àcids grassos, la LPL, minva la seva expressió a la meitat dels seus controls, reduint així la recollida d'àcids grassos transportats per les lipoproteïnes plasmàtiques en forma de triacilglicerols, limitant doncs directament, la deposició de reserves lipídiques. De fet aquestes dades són consistents amb la reducció de l'activitat LPL observada en teixit adipós de rates Zucker obeses, a les que el tractament de 10 dies provocava una reducció del 49% en mesentèric i un 82% en periovàric (Blay i col, 2002).

Les proteïnes transportadores d'aquests àcids grassos cap a l'interior cel·lular i dins d'elles, també es veuen afectades negativament pel tractament. La proteïna transportadora de membrana FATP1 redueix la seva expressió transportant menor quantitat d'àcids grassos lliures, a més, tenint en compte que el tractament amb OE disminueix els nivells d'insulina circulants, aquest efecte encara es pot veure més potenciat degut a la regulació que aquesta exerceix sobre la translocació a membrana de FATP1 (Wu i col, 2006). D'altra banda la FABP4, tal i com era d'esperar, redueix la seva expressió, ja sigui com a conseqüència de l'OE o de retruc per la reduïda expressió de PPAR $\gamma$ 2, responsable del *feed-back* positiu en què col·labora la transportadora lligadora d'àcids grassos (Dancott i col, 2004). De fet, aquests resultats estan d'acord amb la relació existent entre prevalença d'obesitat i major captació d'àcids grassos degut a un increment en les proteïnes transportadores en teixit adipós omental (Bower i col, 2006).

Aquesta menor captació d'àcids grassos per emmagatzemar reserves grasses es veu acompanyada per una forta inhibició de la via lipogènica, i per tant de la nova síntesi d'àcids grassos a partir de substrats d'origen no lipídic. Ja sabem que aquest és un procés altament regulat per hormones i per la dieta, i per tant no ens sorprèn que el tractament amb OE afecti aquesta via, tenint en compte també que el metabolisme glucídic experimenta canvis,

amb un increment de la sensibilització a la insulina. Així no és estrany que la FAS es trobi inhibida en un 95%, no oblidem a més que aquest és un enzim que s'utilitza com a marcador de lipogènesi (Wang i col, 2004) i que es regula principalment a nivell de transcripció gènica. Potenciant aquest efecte de bloqueig lipogènic, la ACC1 es troba infraexpressada en un 92%, l'altre punt clau de la via lipogènica. De fet, s'ha proposat en diverses ocasions la inhibició de la via lipogènica amb el bloqueig de les activitats ACC1 o FAS com a possibles teràpies per combatre la síndrome metabòlica o l'obesitat (Kusunoki, i col, 2006, Harwood, 2004)

Malgrat que darrerament estan sortint a la llum dades relatives a nous enzims amb activitat triacilglicerol hidrolasa, la HSL es considera com un dels principals responsables de l'activitat lipolítica de l'adipòcit. Donat el quadre metabòlic del teixit adipós tractat amb OE, seria esperable una forta activació d'aquest enzim lipolític. Les dades d'aquest treball ens mostren, si més no, una tendència a la reducció de la seva expressió, tot i que no arriba a resultar significativa. No obstant, cal tenir en compte que l'HSL està regulada principalment a nivell post-traducciona (Kraemer i Shen, 2002).

Tot i la baixa activitat de la via de la beta-oxidació associada al teixit adipós (Rossmeisl i col, 2004) també aquesta via es veu afectada pel tractament amb OE, doncs la reducció de l'expressió de la CPT1 limitaria l'entrada dels àcids grassos a l'interior del mitocondri, on serien oxidats per donar lloc a acetil CoA.

Així, el metabolisme lipídic del teixit adipós mesentèric es troba fortament bloquejat a nivell transcripcional. Així doncs, d'una banda ens trobem amb una baixa capacitat del teixit adipós per captar àcids grassos i emmagatzemar-los, però aquesta mateixa cèl·lula també podria tenir problemes per hidrolitzar els triacilglicerols emmagatzemats a la vacuola i oxidar-ne els àcids grassos. De fet, hem de tenir en compte que paral·lelament fenòmens apoptòtics duen a algunes d'aquestes cèl·lules, a una mort cel·lular programada que implica una cascada d'activació que, en el cas estudiat, sembla estar mediatitzada per  $TNF\alpha$ . Una interpretació podria implicar els macròfags infiltrats en el teixit adipós mesentèric com les responsables de la producció d'aquesta citocina pro-apoptòtica que actuaria paracrinament sobre els adipòcits o altres cèl·lules del teixit.

Aquesta situació metabòlica tant extrema en el teixit adipós ens planteja perquè no es reflecteix aquest estat en els paràmetres plasmàtics, doncs tinguem en compte que en aquestes condicions el plasma mostra una normalitat relativa en la que només s'afecten de manera evident els nivells de colesterol. Així els indicadors lipídics en plasma, els àcids grassos lliures o els triglicèrids es mantenen dins la normalitat, tot i la menor captació a nivell de teixit adipós. Aquest fet només es podria explicar si la reduïda captació d'àcids grassos per la LPL adiposa es veiés compensada a nivell muscular, d'acord amb l'increment



de l'activitat LPL en múscul (Blay i col, 2002). Així, l'excés de triacilglicerols no hidrolitzats per la LPL adiposa serien ràpidament captats per la LPL de múscul que els captaria per oxidar-ne els àcids grassos i obtenir-ne l'energia necessària.

De tot el que s'ha comentat podem concloure que l'acció de l'OE sobre el teixit adipós és més complexa del que podríem haver pensat, donada la diversitat metabòlica de les diferents localitzacions del TAB fa que la resposta no sigui única ni homogènia.

## REFERÈNCIES

Aldridge WN, Davison AN. The mechanism of inhibition of cholinesterases by organophosphorus compounds. *Biochem J.* 1953 Dec;55(5):763-6.

Blay M, Peinado-Onsurbe J, Grasa MM, Diaz-Silva M, Fernandez-Lopez JA, Remesar X, Alemany M. Effect of oral oleoyl-estrone treatment on plasma lipoproteins and tissue lipase activities of Zucker lean and obese female rats. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2002 May;26(5):618-26.

Bower JF, Davis JM, Hao E, Barakat HA. Differences in transport of fatty acids and expression of fatty acid transporting proteins in adipose tissue of obese black and white women. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006 Jan;290(1):E87-E91.

Damcott CM, Moffett SP, Feingold E, Barmada MM, Marshall JA, Hamman RF, Ferrell RE. Genetic variation in fatty acid-binding protein-4 and peroxisome proliferator-activated receptor gamma interactively influence insulin sensitivity and body composition in males. *Metabolism.* 2004 Mar;53(3):303-9.

Harwood HJ Jr. Acetyl-CoA carboxylase inhibition for the treatment of metabolic syndrome. *Curr Opin Investig Drugs.* 2004 Mar;5(3):283-9.

Kraemer FB, Shen WJ. Hormone-sensitive lipase: control of intracellular tri-(di-)acylglycerol and cholesteryl ester hydrolysis. *J Lipid Res.* 2002 Oct;43(10):1585-94.

Kusunoki J, Kanatani A, Moller DE. Modulation of fatty acid metabolism as a potential approach to the treatment of obesity and the metabolic syndrome. *Endocrine.* 2006 Feb;29(1):91-100.

Lafontan, M., Berlan, M., 2003. Do regional differences in adipocyte biology provide new pathophysiological insights?. *Trends in Pharmacological Sciences* 24, 276-283.

Remesar X, Fernández-López JA, Blay MT, Savall P, Salas A, Díaz-Silva M, Esteve M, Grasa MM & Alemany M Effect of oleoyl-estrone on adipose tissue composition in male rats. *Int J Obes* 2002 26, 1092–1102.

Rossmeisl M, Flachs P, Brauner P; Sponarova J, Matejkova O, Prazak T, Ruzikova J, Bardova K, Kuda O & Kopecky J Role of energy charge and AMP-activated protein kinase in adipocytes in the control of body fat stores. *Int J Obes* (2004) 28, S38-S44

Sanchis D, Balada F, Pico C, Grasa MM, Virgili J, Farrerons C, Palou A, Fernandez-Lopez JA, Remesar X, Alemany M. Rats receiving the slimming agent oleoyl-estrone in liposomes (Merlin-2) decrease food intake but maintain thermogenesis. *Arch Physiol Biochem*. 1997 Dec;105(7):663-72.

Troyer D i Fernandes G. Nutrition and apoptosis. *Nutr Res* 1999 16, 1959–1987.

Wang Y, Voy BJ, Urs S et al. The human fatty acid synthase gene and de novo lipogenesis are co-ordinately regulated in human adipose tissue. *J Nutr* 2004 134, 1032-1038.

Wu Q, Ortegon AM, Tsang B, Doege H, Feingold KR, Stahl A. FATP1 is an insulin-sensitive fatty acid transporter involved in diet-induced obesity. *Mol Cell Biol*. 2006 May;26(9):3455-67

Xu H, Sethi JK, Hotamisligil GS. Transmembrane tumor necrosis factor (TNF)-alpha inhibits adipocyte differentiation by selectively activating TNF receptor 1. *J Biol Chem*. 1999 Sep 10;274(37):26287-95.

## **VI. CONCLUSIONS**



1. Les cèl·lules 3T3-L1 presenten una activitat esterasa capaç d'hidrolitzar l'OE. Aquesta activitat es localitza en les fraccions subcel·lulars de la membrana plasmàtica i els microsomes d'alta densitat (lisosomes i reticle endoplasmàtic rugós). Al menys una part d'aquesta activitat enzimàtica és inhibible per PMSF i per tant requereix de grups serina per la catàlisi. Es pot classificar dins el grup de les serina esterases.

2. Els efectes del tractament amb OE no són una mera conseqüència de la restricció de la ingesta. Així, a diferència del model *pair-fed*, el tractament amb OE provoca una mobilització de les reserves lipídiques acompanyat d'un manteniment de les reserves glucídiques.

3. La reducció de la ingesta induïda pel tractament amb OE es pot apreciar ja a les 3 hores de tractament. Els efectes més primerencs a nivell metabòlic s'observen a les 6 hores amb una reducció sobre els nivells de colesterol plasmàtic.

4. L'OE accelera el recanvi de colesterol esterificat a molt curt termini, amb una disminució significativa de la seva vida mitja en plasma a les 6 hores d'iniciat el tractament, que encara es més marcada a les 72 hores

5. El tractament amb OE fa que el teixit adipós retroperitoneal i el periovàric redueixin la seva massa, com a conseqüència de la mobilització lipídica més que per una alteració del ritme de diferenciació adipocitària. A més, la localització periovàrica experimenta un increment a curt termini (48 hores de tractament) de Bax i caspasa 3 que indiquen una activació apoptòtica per la via intrínseca.

6. El teixit adipós subcutani redueix l'expressió de PPAR $\beta$  a les 48 hores del tractament i no mostra canvis en l'expressió dels factors apoptòtics estudiats.

7. El tractament amb OE induïx les cèl·lules del teixit adipós mesentèric a una mort cel·lular programada (increment de caspasa 8, caspasa 3, Bid i Bax) activada per la via dels receptors de mort cel·lular, però que s'amplifica també per la via intrínseca. La reducció de l'expressió de PPAR $\gamma$ 2 a curt termini (48hores) implica també una disminució del potencial adipogènic.

8. El tractament a curt termini amb OE (48 hores) provoca canvis en l'expressió gènica del teixit adipós mesentèric de nombrosos gens relacionats amb el metabolisme lipídic. Concretament hem comprovat una menor captació d'àcids grassos de les lipoproteïnes (LPL) una reducció de la lipogènesi (FAS i ACC), una reduïda capacitat de transport d'àcids grassos (FATP1 i FABP4) i de la seva oxidació (CPT1). També s'ha observat una tendència a reduir la via lipolítica (HSL) i un augment de l'expressió de la citocina proinflamatòria i proapoptòtica TNF $\alpha$ .



## **VII. BIBLIOGRAFIA**





Abbott CR, Rossi M, Wren AM, Murphy KG, Kennedy AR, Stanley SA, Zollner AN, Morgan DG, Morgan I, Ghatei MA, Small CJ, Bloom SR. Evidence of an orexigenic role for cocaine- and amphetamine-regulated transcript after administration into discrete hypothalamic nuclei. *Endocrinology*. 2001 Aug;142(8):3457-63.

Acehan D, Jiang X, Morgan DG, Heuser JE, Wang X, Akey CW. Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell*. 2002 Feb;9(2):423-32.

Adan C, Cabot C, Vila R, Grasa MM, Masanes RM, Esteve M, Estruch J, Fernandez-Lopez JA, Remesar X, Alemany M. Oleoyl-estrone treatment affects the ponderostat setting differently in lean and obese Zucker rats. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1999a Apr;23(4):366-73.

Adan C, Grasa MM, Cabot C, Esteve M, Vila R, Masanes R, Estruch J, Fernandez-Lopez JA, Remesar X, Alemany M. Short-term treatment with estrone oleate in liposomes (Merlin-2) does not affect the expression of the ob gene in Zucker obese rats. *Mol Cell Biochem*. 1999b Jul;197(1-2):109-15.

Adrian TE, Allen JM, Bloom SR, Ghatei MA, Rossor MN, Roberts GW, Crow TJ, Tatemoto K, Polak JM. Neuropeptide Y distribution in human brain. *Nature*. 1983 Dec 8-14;306(5943):584-6.

Ahima RS, Flier JS. Leptin. *Annu Rev Physiol*. 2000;62:413-37.

Ailhaud G, Amri E, Bardon S, Barcellini-Couget S, Bertrand B, Catalioto RM, Dani C, Doglio A, Forest C, Gaillard D, et al. Growth and differentiation of regional adipose tissue: molecular and hormonal mechanisms. *Int J Obes*. 1991 Sep;15 Suppl 2:87-90. Review.

Aja S, Robinson BM, Mills KJ, Ladenheim EE, Moran TH. Fourth ventricular CART reduces food and water intake and produces a conditioned taste aversion in rats. *Behav Neurosci*. 2002 Oct;116(5):918-21.

Alemany M, Fernández-López JA, Petrobelli A, Granada M, Foz M i Remesar X. Pérdida de peso en un paciente con obesidad mórbida en tratamiento con oleoil-estrone. *Med Clin* 2003; 121(13):496-9.

*Am J Physiol*. 1991 Feb;260(2 Pt 2):R328-34. Neuropeptide Y suppresses sympathetic activity to interscapular brown adipose tissue in rats. Egawa M, Yoshimatsu H, Bray GA.

Amri EZ, Bertrand B, Ailhaud G, Grimaldi P. Regulation of adipose cell differentiation. I. Fatty acids are inducers of the aP2 gene expression. *J Lipid Res*. 1991 Sep;32(9):1449-56.

Anand BK. Nervous regulation of food intake. *Planta Med*. 1961 Oct;41:677-708.

Ardevol A, Virgili J, Sanchis D, Adan C, Fernandez-Real JM, Fernandez-Lopez JA, Remesar X, Alemany M. A method for the measurement of plasma estrone fatty ester levels. *Anal Biochem.* 1997 Jul 1;249(2):247-50.

Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999 Apr 2;257(1):79-83.

Asada N, Takahashi Y, Wada M, Naito N, Uchida H, Ikeda M, Honjo M. GH induced lipolysis stimulation in 3T3-L1 adipocytes stably expressing hGHR: analysis on signaling pathway and activity of 20K hGH. *Mol Cell Endocrinol.* 2000 Apr 25;162(1-2):121-9.

Ashkenazi A. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer.* 2002 Jun;2(6):420-30. Review

Assimacopoulos-Jeannet F, Brichard S, Rencurel F, Cusin I, Jeanrenaud B. In vivo effects of hyperinsulinemia on lipogenic enzymes and glucose transporter expression in rat liver and adipose tissues. *Metabolism.* 1995 Feb;44(2):228-33.

Bagdade JD, Bierman EL, Porte D Jr. The significance of basal insulin levels in the evaluation of the insulin response to glucose in diabetic and nondiabetic subjects. *J Clin Invest.* 1967 Oct;46(10):1549-57.

Bai FL, Yamano M, Shiotani Y, Emson PC, Smith AD, Powell JF, Tohyama M. An arcuato-paraventricular and -dorsomedial hypothalamic neuropeptide Y-containing system which lacks noradrenaline in the rat. *Brain Res.* 1985 Apr 1;331(1):172-5

Balada F, Sanchis D, Grasa MM, Virgili J, Estruch J, Fernandez-Lopez JA, Remesar X, Alemany M. Effect of the slimming agent oleoyl-estrone in liposomes on the body weight of Zucker obese rats. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1997a Sep;21(9):789-95

Balada F, Sanchis D, Grasa MM, Virgili J, Estruch J, Fernandez-Lopez JA, Remesar X, Alemany M. Differential short-term distribution of estrone and oleoyl-estrone administered in liposomes to lean and obese Zucker rats. *Obes Res.* 1998 Jan;6(1):34-9.

Balada F, Sanchis D, Virgili J, Grasa MM, Monserrat C, Fernandez-Lopez JA, Remesar X, Alemany M. Effect of the slimming agent oleoyl-estrone in liposomes on the body weight of rats fed a cafeteria diet. *Arch Physiol Biochem.* 1997b Sep;105(5):487-95

Banks WA, Kastin AJ, Huang W, Jaspan JB, Maness LM. Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin. *Peptides.* 1996;17(2):305-11.

Bannon AW, Seda J, Carmouche M, Francis JM, Norman MH, Karbon B, McCaleb ML. Behavioral characterization of neuropeptide Y knockout mice. *Brain Res.* 2000 Jun 16;868(1):79-87.

Bastie C, Luquet S, Holst D, Jehl-Pietri C, Grimaldi PA. Alterations of peroxisome proliferator-activated receptor delta activity affect fatty acid-controlled adipose differentiation. *J Biol Chem.* 2000 Dec 8;275(49):38768-73.

Baura GD, Foster DM, Porte D Jr, Kahn SE, Bergman RN, Cobelli C, Schwartz MW. Saturable transport of insulin from plasma into the central nervous system of dogs in vivo. A mechanism for regulated insulin delivery to the brain. *J Clin Invest.* 1993 Oct;92(4):1824-30.

Belelli D, Lambert JJ. Neurosteroids: endogenous regulators of the GABA(A) receptor. *Nat Rev Neurosci.* 2005 Jul;6(7):565-75.

Benoit SC, Air EL, Coolen LM, Strauss R, Jackman A, Clegg DJ, Seeley RJ, Woods SC. The catabolic action of insulin in the brain is mediated by melanocortins. *J Neurosci.* 2002 Oct 15;22(20):9048-52.

Billington CJ, Briggs JE, Grace M, Levine AS. Effects of intracerebroventricular injection of neuropeptide Y on energy metabolism. *Am J Physiol.* 1991 Feb;260(2 Pt 2):R321-7.

Bishop-Bailey D, Hla T. Endothelial cell apoptosis induced by the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) ligand 15-deoxy-Delta12, 14-prostaglandin J2. *J Biol Chem.* 1999 Jun 11;274(24):17042-8.

Bittencourt JC, Elias CF. Diencephalic origins of melanin-concentrating hormone immunoreactive projections to medial septum/diagonal band complex and spinal cord using two retrograde fluorescent tracers. *Ann N Y Acad Sci.* 1993 May 31;680:462-5.

Bjorbaek C, Kahn BB. Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. *Recent Prog Horm Res.* 2004;59:305-31. Review.

Bjorntorp P. Endocrine abnormalities of obesity. *Metabolism.* 1995 Sep;44(9 Suppl 3):21-3. Review.

Blay M, Peinado-Onsurbe J, Grasa MM, Diaz-Silva M, Fernandez-Lopez JA, Remesar X, Alemany M. Effect of oral oleoyl-estrone treatment on plasma lipoproteins and tissue lipase activities of Zucker lean and obese female rats. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2002 May;26(5):618-26.

Botion LM, Green A. Long-term regulation of lipolysis and hormone-sensitive lipase by insulin and glucose. *Diabetes.* 1999 Sep;48(9):1691-7.

Bouloumie A, Drexler HC, Lafontan M, Busse R. Leptin, the product of Ob gene, promotes angiogenesis. *Circ Res*. 1998 Nov 16;83(10):1059-66.

Brady LS, Smith MA, Gold PW, Herkenham M. Altered expression of hypothalamic neuropeptide mRNAs in food-restricted and food-deprived rats. *Neuroendocrinology*. 1990 Nov;52(5):441-7.

Brasaemle DL, Levin DM, Adler-Wailes DC, Londos C. The lipolytic stimulation of 3T3-L1 adipocytes promotes the translocation of hormone-sensitive lipase to the surfaces of lipid storage droplets. *Biochim Biophys Acta*. 2000 Jan 17;1483(2):251-62.

Breckenridge DG, Germain M, Mathai JP, Nguyen M, Shore GC. Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene*. 2003 Nov 24;22(53):8608-18. Review.

Broberger C, De Lecea L, Sutcliffe JG, Hokfelt T. Hypocretin/orexin- and melanin-concentrating hormone-expressing cells form distinct populations in the rodent lateral hypothalamus: relationship to the neuropeptide Y and agouti gene-related protein systems. *J Comp Neurol*. 1998 Dec 28;402(4):460-74.

Cabot C, del Mar Grasa M, Estruch J, Fernandez-Lopez JA, Remesar X, Alemany M. Zucker obese rats are insensitive to the CRH-increasing effect of oleoyl-estrone. *Brain Res Bull*. 1998b Aug;46(6):529-34.

Cabot C, del Mar Grasa M, Fernandez-Lopez JA, Alemany M. Effect of oleoyl-estrone treatment on the expression of beta1- beta2- and beta3-adrenoreceptors in rat adipose tissues. *Mol Cell Biochem*. 2001a May;221(1-2):109-15.

Cabot C, Esteve M, Grasa MM, Vilà R, Adan C, Fernández-López JA, Remesar X, Alemany M. Potenciación de la respuesta insulínica a una sobrecarga oral de glucosa en ratas Zucker obesas tratadas con oleoil-estrone. *Endocrinol Nutr* 2002; 49(1):9-12

Cabot C, Grasa MM, Adan C, Perez-Clausell J, Virgili J, Estruch J, Fernandez-Lopez JA, Remesar X, Alemany M. Oleoyl-estrone does not alter hypothalamic neuropeptide Y in Zucker lean and obese rats. *Peptides*. 1998a;19(9):1631-5.

Cabot C, Grasa MM, Fernandez-Lopez JA, Alemany M. Oleoyl-estrone treatment reduces the volume of white adipose tissue cells in the rat. *J Physiol Biochem*. 2000a Dec;56(4):369-70.

Cabot C, Grasa MM, Massanes RM, de Matteis R, Cinti S, Fernandez-Lopez JA, Remesar X, Alemany M. Oleoyl-estrone does not have direct estrogenic effects on rats. *Life Sci*. 2001b Jul 6;69(7):749-61.

Cabot C, Masanes R, Bullo M, Garcia-Lorda P, Fernandez-Lopez JA, Salas-Salvado J, Alemany M. Plasma acyl-estrone levels are altered in obese women. *Endocr Res.* 2000b Aug;26(3):465-76.

Cabot C, Salas A, Ferrer-Lorente R, Savall P, Remesar X, Fernandez-Lopez JA, Esteve M, Alemany M. Short-term oral oleoyl-estrone treatment increases plasma cholesterol turnover in the rat. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2005 May;29(5):534-9.

Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science.* 1995 Jul 28;269(5223):546-9.

Casteilla L, Charriere G, Laharrague P, Cousin B, Planat-Benard V, Pericaud L, Chavoïn JP. Adipose tissue, plastic and reconstructive surgery: come back to sources. *Ann Chir Plast Esthet.* 2004 Oct;49(5):409-18.

Chandran M, Phillips SA, Ciaraldi T, Henry RR. Adiponectin: more than just another fat cell hormone? *Diabetes Care.* 2003 Aug;26(8):2442-50.

Chehab FF, Lim ME, Lu R. Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nat Genet.* 1996 Mar;12(3):318-20.

Chen H, Charlat O, Tartaglia LA, Woolf EA, Weng X, Ellis SJ, Lakey ND, Culpepper J, Moore KJ, Breitbart RE, Duyk GM, Tepper RI, Morgenstern JP. Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell.* 1996 Feb 9;84(3):491-5.

Chen H, Montagnani M, Funahashi T, Shimomura I, Quon MJ. Adiponectin stimulates production of nitric oxide in vascular endothelial cells. *J Biol Chem.* 2003 Nov 7;278(45):45021-6. Epub 2003 Aug 27.

Chen P, Li C, Haskell-Luevano C, Cone RD, Smith MS. Altered expression of agouti-related protein and its colocalization with neuropeptide Y in the arcuate nucleus of the hypothalamus during lactation. *Endocrinology.* 1999 Jun;140(6):2645-50.

Chen WC, Lin MS, Bai X. Induction of apoptosis in colorectal cancer cells by peroxisome proliferators-activated receptor gamma activation up-regulating PTEN and inhibiting PI3K activity. *Chin Med J (Engl).* 2005 Sep 5;118(17):1477-81.

Cheung CC, Clifton DK, Steiner RA. Proopiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus. *Endocrinology.* 1997 Oct;138(10):4489-92.

Cheung CC, Hohmann JG, Clifton DK, Steiner RA. Distribution of galanin messenger RNA-expressing cells in murine brain and their regulation by leptin in regions of the hypothalamus. *Neuroscience*. 2001;103(2):423-32.

Christiansen T, Richelsen B, Bruun JM. Monocyte chemoattractant protein-1 is produced in isolated adipocytes, associated with adiposity and reduced after weight loss in morbid obese subjects. *Int J Obes (Lond)*. 2005 Jan;29(1):146-50.

Cinti S. The adipose organ. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2005 Jul;73(1):9-15.

Cleary MP, Zisk JF. Anti-obesity effect of two different levels of dehydroepiandrosterone in lean and obese middle-aged female Zucker rats. *Int J Obes*. 1986;10(3):193-204.

Coleman DL. Effects of parabiosis of obese with diabetes and normal mice. *Diabetologia*. 1973 Aug;9(4):294-8.

Cooke PS, Naaz A. Role of estrogens in adipocyte development and function. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2004 Dec;229(11):1127-35.

Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer*. 2002 Sep;2(9):647-56. Review.

Cory S, Huang DC, Adams JM. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene*. 2003 Nov 24;22(53):8590-607. Review.

Cottam DR, Mattar SG, Barinas-Mitchell E, Eid G, Kuller L, Kelley DE, Schauer PR. The chronic inflammatory hypothesis for the morbidity associated with morbid obesity: implications and effects of weight loss. *Obes Surg*. 2004 May;14(5):589-600. Review.

Couceyro PR, Koylu EO, Kuhar MJ. Further studies on the anatomical distribution of CART by in situ hybridization. *J Chem Neuroanat*. 1997 May;12(4):229-41.

Cousin B, Munoz O, Andre M, Fontanilles AM, Dani C, Cousin JL, Laharrague P, Casteilla L, Penicaud L. A role for preadipocytes as macrophage-like cells. *FASEB J*. 1999 Feb;13(2):305-12.

Crawford DA, Jeffery RW, French SA. Television viewing, physical inactivity and obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1999 Apr;23(4):437-40.

Crawley JN, Corwin RL. Biological actions of cholecystokinin. *Peptides*. 1994;15(4):731-55

Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes*. 2001 Aug;50(8):1714-9.

Curat CA, Miranville A, Sengenès C, Diehl M, Tonus C, Busse R, Bouloumie A. From blood monocytes to adipose tissue-resident macrophages: induction of diapedesis by human mature adipocytes. *Diabetes*. 2004 May;53(5):1285-92.

D'Alessio DA, Kieffer TJ, Taborsky GJ Jr, Havel PJ. Activation of the parasympathetic nervous system is necessary for normal meal-induced insulin secretion in rhesus macaques. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001 Mar;86(3):1253-9.

Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell*. 2004 Jan 23;116(2):205-19. Review

Date Y, Murakami N, Toshinai K, Matsukura S, Niiijima A, Matsuo H, Kangawa K, Nakazato M. The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. *Gastroenterology*. 2002 Oct;123(4):1120-8.

De Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao X, Foye PE, Danielson PE, Fukuhara C, Battenberg EL, Gautvik VT, Bartlett FS 2nd, Frankel WN, van den Pol AN, Bloom FE, Gautvik KM, Sutcliffe JG. The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Jan 6;95(1):322-7.

Delporte ML, Funahashi T, Takahashi M, Matsuzawa Y, Brichard SM. Pre- and post-translational negative effect of beta-adrenoceptor agonists on adiponectin secretion: in vitro and in vivo studies. *Biochem J*. 2002 Nov 1;367(Pt 3):677-85.

Dhurandhar NV, Israel BA, Kolesar JM, Mayhew GF, Cook ME, Atkinson RL. Increased adiposity in animals due to a human virus. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2000 Aug;24(8):989-96.

Dietze D, Koenen M, Rohrig K, Horikoshi H, Hauner H, Eckel J. Impairment of insulin signaling in human skeletal muscle cells by co-culture with human adipocytes. *Diabetes*. 2002 Aug;51(8):2369-76.

Diez JJ, Iglesias P. The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease. *Eur J Endocrinol*. 2003 Mar;148(3):293-300. Review.

Dodson, M.V., M.E. Fernyhough, J.L. Vierck, and G.J. Hausman. Adipocytes may not be a terminally differentiated cell type: Implications for animal production. *Animal Science* 2005. 80(3):239-240

Douglass J, Daoud S. Characterization of the human cDNA and genomic DNA encoding CART: a cocaine- and amphetamine-regulated transcript. *Gene*. 1996 Mar 9;169(2):241-5.

Dubuc PU. Effects of estrogen on food intake, body weight, and temperature of male and female obese mice. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1985 Dec;180(3):468-73.

Ducy P, Amling M, Takeda S, Priemel M, Schilling AF, Beil FT, Shen J, Vinson C, Rueger JM, Karsenty G. Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell*. 2000 Jan 21;100(2):197-207.

Egawa M, Yoshimatsu H, Bray GA. Preoptic area injection of corticotropin-releasing hormone stimulates sympathetic activity. *Am J Physiol*. 1990 Oct;259(4 Pt 2):R799-806.

Ehrhart-Bornstein M, Lamounier-Zepter V, Schraven A, Langenbach J, Willenberg HS, Barthel A, Hauner H, McCann SM, Scherbaum WA, Bornstein SR. Human adipocytes secrete mineralocorticoid-releasing factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Nov 25;100(24):14211-6. Epub 2003 Nov 12.

Ekblad E, Sundler F. Distribution of pancreatic polypeptide and peptide YY. *Peptides*. 2002 Feb;23(2):251-61.

Elias CF, Lee C, Kelly J, Aschkenasi C, Ahima RS, Couceyro PR, Kuhar MJ, Saper CB, Elmquist JK. Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord. *Neuron*. 1998 Dec;21(6):1375-85.

Enmark E, Gustafsson JA. Orphan nuclear receptors - the first eight years. *Mol Endocrinol*. 1996 Nov;10(11):1293-307. Review.

Esper DH, Harb WA. The cancer cachexia syndrome: a review of metabolic and clinical manifestations. *Nutr Clin Pract*. 2005 Aug;20(4):369-76.

Esteve M, Savall P, Blay MT, Fernandez-Lopez JA, Remesar X, Alemany M. Intestinal handling of an oral oleoyl-estrone gavage by the rat. *Life Sci* 2001b Jul 6;69(7):763-77.

Esteve M, Savall P, Virgili J, Fernandez-Lopez JA, Remesar X, Alemany M. Modulation by leptin, insulin and corticosterone of oleoyl-estrone synthesis in cultured 3T3 L1 cells. *Biosci Rep*. 2001a Dec;21(6):755-63.

Esteve M, Virgili J, Aguilar H, Balada F, Fernandez-Lopez JA, Remesar X, Alemany M. Leptin enhances the synthesis of oleoyl-estrone from estrone in white adipose tissue. *Eur J Nutr*. 1999 Apr;38(2):99-104.

Etherton TD. The biology of somatotropin in adipose tissue growth and nutrient partitioning. *J Nutr*. 2000 Nov;130(11):2623-5.



Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol.* 1992 Apr 1;148(7):2207-16.

Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P, Bahouth SW. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology.* 2004 May;145(5):2273-82. Epub 2004 Jan 15.

Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P, Bahouth SW. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology.* 2004 May;145(5):2273-82. Epub 2004 Jan 15.

Fasshauer M, Klein J, Neumann S, Eszlinger M, Paschke R. Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 Jan 25;290(3):1084-9.

Fasshauer M, Kralisch S, Klier M, Lossner U, Bluher M, Klein J, Paschke R. Adiponectin gene expression and secretion is inhibited by interleukin-6 in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Feb 21;301(4):1045-50

Feher T, Bodrogi L. A comparative study of steroid concentrations in human adipose tissue and the peripheral circulation. *Clin Chim Acta.* 1982 Dec 9;126(2):135-41.

Fekete C, Sarkar S, Rand WM, Harney JW, Emerson CH, Bianco AC, Beck-Sickingler A, Lechan RM. Neuropeptide Y1 and Y5 receptors mediate the effects of neuropeptide Y on the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. *Endocrinology.* 2002 Dec;143(12):4513-9.

Felmer RN, Clark JA. The gene suicide system Ntr/CB1954 causes ablation of differentiated 3T3L1 adipocytes by apoptosis. *Biol Res.* 2004;37(3):449-60.

Fernandez-Lopez JA, Remesar X, Foz M, Alemany M. Pharmacological approaches for the treatment of obesity. *Drugs.* 2002;62(6):915-44.

Fernandez-Real JM, Ricart W. Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome. *Endocr Rev.* 2003 Jun;24(3):278-301. Review.

Fernandez-Real JM, Sanchis D, Ricart W, Casamitjana R, Balada F, Remesar X, Alemany M. Plasma oestrone-fatty acid ester levels are correlated with body fat mass in humans. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1999 Feb;50(2):253-60.

Ferrer-Lorente R, Garcia-Pelaez B, Fernandez-Lopez JA, Remesar X, Alemany M. Tamoxifen does not prevent the mobilization of body lipids elicited by oleoyl-estrone. *Steroids*. 2004 Sep;69(10):661-5.

Ferri KF, Kroemer G. Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat Cell Biol*. 2001 Nov;3(11):E255-63. Review.

Fisher RM, Gertow K. Fatty acid transport proteins and insulin resistance. *Curr Opin Lipidol*. 2005 Apr;16(2):173-8.

Flier JS. Clinical review 94: What's in a name? In search of leptin's physiologic role. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998 May;83(5):1407-13. Review

Flier JS. Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell*. 2004 Jan 23;116(2):337-50. Review.

Foufelle F, Ferre P. New perspectives in the regulation of hepatic glycolytic and lipogenic genes by insulin and glucose: a role for the transcription factor sterol regulatory element binding protein-1c. *Biochem J*. 2002 Sep 1;366(Pt 2):377-91.

Friedman JM. Leptin, leptin receptors and the control of body weight. *Eur J Med Res*. 1997 Jan;2(1):7-13.

Frühbeck G, Aguado M, Gomez-Ambrosi J, Martinez JA. Lipolytic effect of in vivo leptin administration on adipocytes of lean and ob/ob mice, but not db/db mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998 Sep 8;250(1):99-102.

Frühbeck G, Aguado M, Martinez JA. In vitro lipolytic effect of leptin on mouse adipocytes: evidence for a possible autocrine/paracrine role of leptin. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997 Nov 26;240(3):590-4.

Fruhbeck G. Pivotal role of nitric oxide in the control of blood pressure after leptin administration. *Diabetes*. 1999 Apr;48(4):903-8.

Fu-Cheng X, Anini Y, Chariot J, Castex N, Galmiche JP, Roze C. Mechanisms of peptide YY release induced by an intraduodenal meal in rats: neural regulation by proximal gut. *Pflugers Arch*. 1997 Mar;433(5):571-9.

Gainsford T, Willson TA, Metcalf D, Handman E, McFarlane C, Ng A, Nicola NA, Alexander WS, Hilton DJ. Leptin can induce proliferation, differentiation, and functional activation of hemopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Dec 10;93(25):14564-8.

Garton AJ, Campbell DG, Carling D, Hardie DG, Colbran RJ, Yeaman SJ. Phosphorylation of bovine hormone-sensitive lipase by the AMP-activated protein kinase. A possible antilipolytic mechanism. *Eur J Biochem*. 1989 Jan 15;179(1):249-54.

Gibbs J, Young RC, Smith GP. Cholecystokinin decreases food intake in rats. 1973. *Obes Res.* 1997 May;5(3):284-90.

Glatz JF, Luiken JJ, van Bilsen M, van der Vusse GJ. Cellular lipid binding proteins as facilitators and regulators of lipid metabolism. *Mol Cell Biochem.* 2002 Oct;239(1-2):3-7.

Glatz JF, Storch J. Unravelling the significance of cellular fatty acid-binding proteins. *Curr Opin Lipidol.* 2001 Jun;12(3):267-74.

Graham A, Wakamatsu K, Hunt G, Ito S, Thody AJ. Agouti protein inhibits the production of eumelanin and pheomelanin in the presence and absence of alpha-melanocyte stimulating hormone. *Pigment Cell Res.* 1997 Oct;10(5):298-303.

Grasa MM, Cabot C, Adan C, Sanchis D, Balada F, Estruch J, Fernandez-Lopez JA, Remesar X, Alemany M. Effect of oleoyl-estrone administration on corticosterone binding to tissues of lean and obese Zucker rats. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1998a Aug;66(3):165-9.

Grasa MM, Cabot C, Adan C, Vila R, Esteve M, Estruch J, Fernandez-Lopez JA, Remesar X, Alemany M. Effect of adrenalectomy on the slimming activity of liposome-carried oleoyl-estrone in the rat. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 1998b Dec;22(12):1225-30.

Grasa MM, Cabot C, Esteve M, Yubero P, Masanes RM, Blay MT, Vila R, Lopez-Marti J, Fernandez-Lopez JA, Remesar X, Alemany M. Daily oral oleoyl-estrone gavage induces a dose-dependent loss of fat in Wistar rats. *Obes Res.* 2001a Mar;9(3):202-9.

Grasa MM, Esteve M, Masanes RM, Yubero P, Blay M, Lopez-Marti J, Cabot C, Vila R, Fernandez-Lopez JA, Remesar X, Alemany M. Oral gavage of oleoyl-oestrone has a stronger effect on body weight in male Zucker obese rats than in female. *Diabetes Obes Metab.* 2001b Jun;3(3):203-8.

Grasa MM, Vila R, Esteve M, Cabot C, Fernandez-Lopez JA, Remesar X, Alemany M. Oleoyl-estrone lowers the body weight of both ob/ob and db/db mice. *Horm Metab Res.* 2000 Jun;32(6):246-50.

Gray JM, Nunez AA, Siegel LI, Wade GN. Effects of testosterone on body weight and adipose tissue: role of aromatization. *Physiol Behav.* 1979 Sep;23(3):465-9.

Green A, Dobias SB, Walters DJ, Brasier AR. Tumor necrosis factor increases the rate of lipolysis in primary cultures of adipocytes without altering levels of hormone-sensitive lipase. *Endocrinology.* 1994 Jun;134(6):2581-8.

Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science.* 1998 Aug 28;281(5381):1309-12.

Gundlach AL, Burazin TC, Larm JA. Distribution, regulation and role of hypothalamic galanin systems: renewed interest in a pleiotropic peptide family. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2001 Jan-Feb;28(1-2):100-5.

Hahn TM, Breininger JF, Baskin DG, Schwartz MW. Coexpression of *Agrp* and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nat Neurosci.* 1998 Aug;1(4):271-2.

Halleux CM, Takahashi M, Delporte ML, Detry R, Funahashi T, Matsuzawa Y, Brichard SM. Secretion of adiponectin and regulation of *apM1* gene expression in human visceral adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001 Nov 16;288(5):1102-7.

Hamilton JA, Guo W, Kamp F. Mechanism of cellular uptake of long-chain fatty acids: Do we need cellular proteins? *Mol Cell Biochem.* 2002 Oct;239(1-2):17-23.

Hamilton JA, Kamp F. How are free fatty acids transported in membranes? Is it by proteins or by free diffusion through the lipids? *Diabetes.* 1999 Dec;48(12):2255-69.

Hardie DG, Carling D. The AMP-activated protein kinase - fuel gauge of the mammalian cell? *Eur J Biochem.* 1997 Jun 1;246(2):259-73.

Hardie DG, Pan DA. Regulation of fatty acid synthesis and oxidation by the AMP-activated protein kinase. *Biochem Soc Trans.* 2002 Nov;30(Pt 6):1064-70. Review.

Harwood HJ Jr, Petras SF, Shelly LD, Zaccaro LM, Perry DA, Makowski MR, Hargrove DM, Martin KA, Tracey WR, Chapman JG, Magee WP, Dalvie DK, Soliman VF, Martin WH, Mularski CJ, Eisenbeis SA. Isozyme-nonselective N-substituted bipiperidylcarboxamide acetyl-CoA carboxylase inhibitors reduce tissue malonyl-CoA concentrations, inhibit fatty acid synthesis, and increase fatty acid oxidation in cultured cells and in experimental animals. *J Biol Chem.* 2003 Sep 26;278(39):37099-111.

Haskell-Luevano C, Monck EK. Agouti-related protein functions as an inverse agonist at a constitutively active brain melanocortin-4 receptor. *Regul Pept.* 2001 May 5;99(1):1-7.

Havel JR. Receptor and non-receptor mediated uptake of chylomicron remnants by the liver. *Atherosclerosis* 1998;141 (Suppl.1):S1-S7.

Hennino A, Berard M, Krammer PH, Defrance T. FLICE-inhibitory protein is a key regulator of germinal center B cell apoptosis. *J Exp Med.* 2001 Feb 19;193(4):447-58.

Hernandez JS, Watson RW, Wood TC, Weinshilboum RM. Sulfation of estrone and 17 beta-estradiol in human liver. Catalysis by thermostable phenol sulfotransferase and by dehydroepiandrosterone sulfotransferase. *Drug Metab Dispos.* 1992 May-Jun;20(3):413-22.

Herrmann C, Goke R, Richter G, Fehmann HC, Arnold R, Goke B. Glucagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulin-releasing polypeptide plasma levels in response to nutrients. *Digestion*. 1995;56(2):117-26.

Herrmann T, Buchkremer F, Gosch I, Hall AM, Bernlohr DA, Stremmel W. Mouse fatty acid transport protein 4 (FATP4): characterization of the gene and functional assessment as a very long chain acyl-CoA synthetase. *Gene*. 2001 May 30;270(1-2):31-40.

Hervieu GJ, Cluderay JE, Harrison DC, Roberts JC, Leslie RA. Gene expression and protein distribution of the orexin-1 receptor in the rat brain and spinal cord. *Neuroscience*. 2001;103(3):777-97.

Holm C. Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Biochem Soc Trans*. 2003 Dec;31(Pt 6):1120-4.

Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*. 1993 Jan 1;259(5091):87-91.

Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y, Iwahashi H, Kuriyama H, Ouchi N, Maeda K, Nishida M, Kihara S, Sakai N, Nakajima T, Hasegawa K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Nakamura T, Yamashita S, Hanafusa T, Matsuzawa Y. Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000 Jun;20(6):1595-9.

Hotta K, Funahashi T, Bodkin NL, Ortmeyer HK, Arita Y, Hansen BC, Matsuzawa Y. Circulating concentrations of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during the progression to type 2 diabetes in rhesus monkeys. *Diabetes*. 2001 May;50(5):1126-33.

Hsu YT, Wolter KG, Youle RJ. Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Apr 15;94(8):3668-72.

Inui A. Neuropeptide Y feeding receptors: are multiple subtypes involved? *Trends Pharmacol Sci*. 1999 Feb;20(2):43-6.

Iwashima Y, Katsuya T, Ishikawa K, Ouchi N, Ohishi M, Sugimoto K, Fu Y, Motone M, Yamamoto K, Matsuo A, Ohashi K, Kihara S, Funahashi T, Rakugi H, Matsuzawa Y, Ogihara T. Hypoadiponectinemia is an independent risk factor for hypertension. *Hypertension*. 2004 Jun;43(6):1318-23. Epub 2004 May 3.

Jacobson MD, Weil M, Raff MC. Programmed cell death in animal development. *Cell*. 1997 Feb 7;88(3):347-54. Review.

Kakuma T, Lee Y, Higa M, Wang Z, Pan W, Shimomura I, Unger RH. Leptin, troglitazone, and the expression of sterol regulatory element binding proteins in liver and pancreatic islets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Jul 18;97(15):8536-41.

Kappes A, Loffler G. Influences of ionomycin, dibutyryl-cycloAMP and tumour necrosis factor-alpha on intracellular amount and secretion of apM1 in differentiating primary human preadipocytes. *Horm Metab Res*. 2000 Nov-Dec;32(11-12):548-54.

Kelekar A, Thompson CB. Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. *Trends Cell Biol*. 1998 Aug;8(8):324-30. Review.

Kennedy GC. The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. 1953 Jan 15;140(901):578-96.

Kersten S. Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO Rep*. 2001 Apr;2(4):282-6.

Kim JB, Sarraf P, Wright M, Yao KM, Mueller E, Solanes G, Lowell BB, Spiegelman BM. Nutritional and insulin regulation of fatty acid synthetase and leptin gene expression through ADD1/SREBP1. *J Clin Invest*. 1998 Jan 1;101(1):1-9.

Kim SY, Kim HI, Kim TH, Im SS, Park SK, Lee IK, Kim KS, Ahn YH. SREBP-1c mediates the insulin-dependent hepatic glucokinase expression. *J Biol Chem*. 2004 Jul 16;279(29):30823-9.

Kinlaw WB, Marsh B. Adiponectin and HIV-lipodystrophy: taking HAART. *Endocrinology*. 2004 Feb;145(2):484-6. Review. No abstract available.

Kissileff HR, Carretta JC, Geliebter A, Pi-Sunyer FX. Cholecystokinin and stomach distension combine to reduce food intake in humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2003 Nov;285(5):R992-8.

Kissileff HR, Pi-Sunyer FX, Thornton J, Smith GP. C-terminal octapeptide of cholecystokinin decreases food intake in man. *Am J Clin Nutr*. 1981 Feb;34(2):154-60.

Kitada S, Zapata JM, Andreeff M, Reed JC. Bryostatins and CD40-ligand enhance apoptosis resistance and induce expression of cell survival genes in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 1999 Sep;106(4):995-1004.

Kong WM, Stanley S, Gardiner J, Abbott C, Murphy K, Seth A, Connoley I, Ghatei M, Stephens D, Bloom S. A role for arcuate cocaine and amphetamine-regulated transcript in hyperphagia, thermogenesis, and cold adaptation. *FASEB J*. 2003 Sep;17(12):1688-90.

Kraemer FB, Shen WJ. Hormone-sensitive lipase: control of intracellular tri-(di-)acylglycerol and cholesteryl ester hydrolysis. *J Lipid Res*. 2002 Oct;43(10):1585-94.

Krajewski S, Tanaka S, Takayama S, Schibler MJ, Fenton W, Reed JC. Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res.* 1993 Oct 1;53(19):4701-14.

Kristensen P, Judge ME, Thim L, Ribel U, Christjansen KN, Wulff BS, Clausen JT, Jensen PB, Madsen OD, Vrang N, Larsen PJ, Hastrup S. Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature.* 1998 May 7;393(6680):72-6.

Kuida K, Haydar TF, Kuan CY, Gu Y, Taya C, Karasuyama H, Su MS, Rakic P, Flavell RA. Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. *Cell.* 1998 Aug 7;94(3):325-37.

Kumada M, Kihara S, Sumitsuji S, Kawamoto T, Matsumoto S, Ouchi N, Arita Y, Okamoto Y, Shimomura I, Hiraoka H, Nakamura T, Funahashi T, Matsuzawa Y; Osaka CAD Study Group. Coronary artery disease. Association of hypoadiponectinemia with coronary artery disease in men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003 Jan 1;23(1):85-9.

Larsen PJ, Vrang N, Petersen PC, Kristensen P. Chronic intracerebroventricular administration of recombinant CART(42-89) peptide inhibits and causes weight loss in lean and obese Zucker (fa/fa) rats. *Obes Res.* 2000 Nov;8(8):590-6.

Le Lay S, Lefrere I, Trautwein C, Dugail I, Krief S. Insulin and sterol-regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1C) regulation of gene expression in 3T3-L1 adipocytes. Identification of CCAAT/enhancer-binding protein beta as an SREBP-1C target. *J Biol Chem.* 2002 Sep 20;277(38):35625-34.

Leibowitz SF, Wortley KE. Hypothalamic control of energy balance: different peptides, different functions. *Peptides.* 2004 Mar;25(3):473-504.

Letexier D, Pinteur C, Large V, Frering V, Beylot M. Comparison of the expression and activity of the lipogenic pathway in human and rat adipose tissue. *J Lipid Res.* 2003 Nov;44(11):2127-34.

Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell.* 1998 Aug 21;94(4):491-501.

Li HY, Hwang HW, Hu YH. Functional characterizations of cocaine- and amphetamine-regulated transcript mRNA expression in rat hypothalamus. *Neurosci Lett.* 2002 May 3;323(3):203-6.

Li K, Li Y, Shelton JM, Richardson JA, Spencer E, Chen ZJ, Wang X, Williams RS. Cytochrome c deficiency causes embryonic lethality and attenuates stress-induced apoptosis. *Cell.* 2000 May 12;101(4):389-99.

Li LY, Luo X, Wang X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*. 2001 Jul 5;412(6842):95-9.

Liddle RA, Goldfine ID, Rosen MS, Taplitz RA, Williams JA. Cholecystokinin bioactivity in human plasma. Molecular forms, responses to feeding, and relationship to gallbladder contraction. *J Clin Invest*. 1985 Apr;75(4):1144-52.

Lin HC, Chey WY. Cholecystokinin and peptide YY are released by fat in either proximal or distal small intestine in dogs. *Regul Pept*. 2003 Jul 15;114(2-3):131-5.

Lithgow T, van Driel R, Bertram JF, Strasser A. The protein product of the oncogene bcl-2 is a component of the nuclear envelope, the endoplasmic reticulum, and the outer mitochondrial membrane. *Cell Growth Differ*. 1994 Apr;5(4):411-7.

Lobo MJ, Remesar X, Alemany M. Effect of chronic intravenous injection of steroid hormones on body weight and composition of female rats. *Biochem Mol Biol Int*. 1993 Feb;29(2):349-58.

Loftus TM, Jaworsky DE, Frehywot GL, Townsend CA, Ronnett GV, Lane MD, Kuhajda FP. Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors. *Science*. 2000 Jun 30;288(5475):2379-81.

Londos C, Brasaemle DL, Schultz CJ, Adler-Wailes DC, Levin DM, Kimmel AR, Rondinone CM. On the control of lipolysis in adipocytes. *Ann N Y Acad Sci*. 1999 Nov 18;892:155-68.

López-Martí J, Diaz-Silva M, Salas A, del Mar Grasa M, Fernandez-Lopez J, Remesar X, Alemany M. Oleoyl-estrone induces the massive loss of body weight in Zucker fa/fa rats fed a high-energy hyperlipidic diet. *J Nutr Biochem*. 2000 Nov;11(11-12):530-535.

Lord GM, Matarese G, Howard JK, Baker RJ, Bloom SR, Lechler RI. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature*. 1998 Aug 27;394(6696):897-901.

Lowell BB, Spiegelman BM. Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature*. 2000 Apr 6;404(6778):652-60.

Maeda N, Takahashi M, Funahashi T, Kihara S, Nishizawa H, Kishida K, Nagaretani H, Matsuda M, Komuro R, Ouchi N, Kuriyama H, Hotta K, Nakamura T, Shimomura I, Matsuzawa Y. PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes*. 2001 Sep;50(9):2094-9.



Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, Fei H, Kim S, Lallone R, Ranganathan S, et al. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med.* 1995 Nov;1(11):1155-61.

Makowski L, Boord JB, Maeda K, Babaev VR, Uysal KT, Morgan MA, Parker RA, Suttles J, Fazio S, Hotamisligil GS, Linton MF. Lack of macrophage fatty-acid-binding protein aP2 protects mice deficient in apolipoprotein E against atherosclerosis. *Nat Med.* 2001 Jun;7(6):699-705.

Mantzoros C, Petridou E, Dessypris N, Chavelas C, Dalamaga M, Alexe DM, Papadiamantis Y, Markopoulos C, Spanos E, Chrousos G, Trichopoulos D. Adiponectin and breast cancer risk. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Mar;89(3):1102-7.

Margetic S, Gazzola C, Pegg GG, Hill RA. Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2002 Nov;26(11):1407-33. Review.

Marks JL, Porte D Jr, Stahl WL, Baskin DG. Localization of insulin receptor mRNA in rat brain by in situ hybridization. *Endocrinology.* 1990 Dec;127(6):3234-6.

Marsden VS, Strasser A. Control of apoptosis in the immune system: Bcl-2, BH3-only proteins and more. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:71-105. Epub 2001 Dec 19.

Marsh DJ, Miura GI, Yagaloff KA, Schwartz MW, Barsh GS, Palmiter RD. Effects of neuropeptide Y deficiency on hypothalamic agouti-related protein expression and responsiveness to melanocortin analogues. *Brain Res.* 1999 Nov 27;848(1-2):66-77.

Massanes RM, Grasa MM, Lopez-Marti J, Diaz-Silva M, Fernandez-Lopez JA, Remesar X, Alemany M. Zucker obese rats store less acyl-estrone than lean controls. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2003 Apr;27(4):428-32.

McGowan MK, Andrews KM, Kelly J, Grossman SP. Effects of chronic intrahypothalamic infusion of insulin on food intake and diurnal meal patterning in the rat. *Behav Neurosci.* 1990 Apr;104(2):373-85.

Meeran K, O'Shea D, Edwards CM, Turton MD, Heath MM, Gunn I, Abusnana S, Rossi M, Small CJ, Goldstone AP, Taylor GM, Sunter D, Steere J, Choi SJ, Ghatei MA, Bloom SR. Repeated intracerebroventricular administration of glucagon-like peptide-1-(7-36) amide or exendin-(9-39) alters body weight in the rat. *Endocrinology.* 1999 Jan;140(1):244-50.

Mizuno TM, Kleopoulos SP, Bergen HT, Roberts JL, Priest CA, Mobbs CV. Hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA is reduced by fasting and [corrected] in ob/ob and db/db mice, but is stimulated by leptin. *Diabetes.* 1998 Feb;47(2):294-7.

Mizuno TM, Mobbs CV. Hypothalamic agouti-related protein messenger ribonucleic acid is inhibited by leptin and stimulated by fasting. *Endocrinology*. 1999 Feb;140(2):814-7.

Monaghan P, Robertson D, Amos TA, Dyer MJ, Mason DY, Greaves MF. Ultrastructural localization of bcl-2 protein. *J Histochem Cytochem*. 1992 Dec;40(12):1819-25.

Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, Soos MA, Rau H, Wareham NJ, Sewter CP, Digby JE, Mohammed SN, Hurst JA, Cheetham CH, Earley AR, Barnett AH, Prins JB, O'Rahilly S. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature*. 1997 Jun 26;387(6636):903-8.

Montague JW, Cidlowski JA. Cellular catabolism in apoptosis: DNA degradation and endonuclease activation. *Experientia*. 1996 Oct 31;52(10-11):957-62. Review.

Moran TH, Norgren R, Crosby RJ, McHugh PR. Central and peripheral vagal transport of cholecystokinin binding sites occurs in afferent fibers. *Brain Res*. 1990 Aug 27;526(1):95-102.

Moran TH, Robinson PH, Goldrich MS, McHugh PR. Two brain cholecystokinin receptors: implications for behavioral actions. *Brain Res*. 1986 Jan 1;362(1):175-9.

Moran TH, Schwartz GJ. Neurobiology of cholecystokinin. *Crit Rev Neurobiol*. 1994;9(1):1-28

Morris BJ. Neuronal localisation of neuropeptide Y gene expression in rat brain. *J Comp Neurol*. 1989 Dec 15;290(3):358-68.

Nadeau KJ, Leitner JW, Gurerich I, Draznin B. Insulin regulation of sterol regulatory element-binding protein-1 expression in L-6 muscle cells and 3T3 L1 adipocytes. *J Biol Chem*. 2004 Aug 13;279(33):34380-7.

Nagatomo T, Ohnuki T, Ishiguro M, Ahmed M, Nakamura T. Beta-adrenoceptors: three-dimensional structures and binding sites for ligands. *Jpn J Pharmacol*. 2001 Sep;87(1):7-13.

Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K, Matsukura S. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature*. 2001 Jan 11;409(6817):194-8.

Nambu T, Sakurai T, Mizukami K, Hosoya Y, Yanagisawa M, Goto K. Distribution of orexin neurons in the adult rat brain. *Brain Res*. 1999 May 8;827(1-2):243-60.

Nathanson NM. An array of details on G-protein coupled receptor signaling: differential effects of alpha1-adrenergic receptor subtypes on gene expression and cytokine receptor signaling. *Mol Pharmacol*. 2003 May;63(5):959-60.

Neary NM, Small CJ, Bloom SR. Gut and mind. *Gut*. 2003 Jul;52(7):918-21.

Nelson-Dooley C, Della-Fera MA, Hamrick M, Baile CA. Novel treatments for obesity and osteoporosis: targeting apoptotic pathways in adipocytes. *Curr Med Chem.* 2005;12(19):2215-25.

Nishizawa H, Shimomura I, Kishida K, Maeda N, Kuriyama H, Nagaretani H, Matsuda M, Kondo H, Furuyama N, Kihara S, Nakamura T, Tochino Y, Funahashi T, Matsuzawa Y. Androgens decrease plasma adiponectin, an insulin-sensitizing adipocyte-derived protein. *Diabetes.* 2002 Sep;51(9):2734-41.

Niswender KD, Baskin DG, Schwartz MW. Insulin and its evolving partnership with leptin in the hypothalamic control of energy homeostasis. *Trends Endocrinol Metab.* 2004 Oct;15(8):362-9

Nunez NP, Liu H, Meadows GG. PPAR-gamma ligands and amino acid deprivation promote apoptosis of melanoma, prostate, and breast cancer cells. *Cancer Lett.* 2005 Jun 22.

Okuno A, Tamemoto H, Tobe K, Ueki K, Mori Y, Iwamoto K, Umesono K, Akanuma Y, Fujiwara T, Horikoshi H, Yazaki Y, Kadowaki T. Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats. *J Clin Invest.* 1998 Mar 15;101(6):1354-61.

Olalla Gallo MA, Delgado Porres I, Miguel Vazquez MP, Ruiz Moreno A. Cachexia. *Rev Enferm.* 2004 Jul-Aug;27(7-8):49-53, 55-6.

Olsson H, Stralfors P, Belfrage P. Phosphorylation of the basal site of hormone-sensitive lipase by glycogen synthase kinase-4. *FEBS Lett.* 1986 Dec 15;209(2):175-80.

Otto B, Spranger J, Benoit SC, Clegg DJ, Tschop MH. The many faces of ghrelin: new perspectives for nutrition research? *Br J Nutr.* 2005 Jun;93(6):765-71.

Parham ES. The interaction of eating restrains and stressful life events on women's weight and weight changes. *Nutr Res* 1999; 10:832-5.

Paul SM, Purdy RH Neuroactive steroids. *FASEB J* 1992; 6: 2311-2322.

Planat-Benard V, Menard C, Andre M, Puceat M, Perez A, Garcia-Verdugo JM, Penicaud L, Casteilla L. Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells. *Circ Res.* 2004 b Feb 6;94(2):223-9. Epub 2003 Dec 1

Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, Andre M, Nibbelink M, Tamarat R, Clergue M, Manneville C, Saillan-Barreau C, Duriez M, Tedgui A, Levy B, Penicaud L, Casteilla L. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation.* 2004a Feb 10;109(5):656-63. Epub 2004 Jan 20

Plee-Gautier E, Grober J, Duplus E, Langin D, Forest C. Inhibition of hormone-sensitive lipase gene expression by cAMP and phorbol esters in 3T3-F442A and BFC-1 adipocytes. *Biochem J*. 1996 Sep 15;318 ( Pt 3):1057-63.

Pond CM. Paracrine interactions of mammalian adipose tissue. *J Exp Zool A Comp Exp Biol*. 2003 Jan 1;295(1):99-110. Review.

Prins JB, Niesler CU, Winterford CM, Bright NA, Siddle K, O'Rahilly S, Walker NI, Cameron DP. Tumor necrosis factor-alpha induces apoptosis of human adipose cells. *Diabetes*. 1997 Dec;46(12):1939-44.

Prins JB, Niesler CU, Winterford CM, Bright NA, Siddle K, O'Rahilly S, Walker NI, Cameron DP. Tumor necrosis factor-alpha induces apoptosis of human adipose cells. *Diabetes*. 1997 Dec;46(12):1939-44.

Prins JB, O'Rahilly S. Regulation of adipose cell number in man. *Clin Sci (Lond)*. 1997 Jan;92(1):3-11. Review.

Prins JB, Walker NI, Winterford CM, Cameron DP. Apoptosis of human adipocytes in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994b Jun 15;201(2):500-7.

Prins JB, Walker NI, Winterford CM, Cameron DP. Human adipocyte apoptosis occurs in malignancy. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994a Nov 30;205(1):625-30.

Qi Y, Takahashi N, Hileman SM, Patel HR, Berg AH, Pajvani UB, Scherer PE, Ahima RS. Adiponectin acts in the brain to decrease body weight. *Nat Med*. 2004 May;10(5):524-9. Epub 2004 Apr 11. Erratum in: *Nat Med*. 2004 Jun;10(6):649

Qian H, Azain MJ, Compton MM, Hartzell DL, Hausman GJ, Baile CA. Brain administration of leptin causes deletion of adipocytes by apoptosis. *Endocrinology*. 1998 Feb;139(2):791-4.

Qian H, Hausman DB, Compton MM, Martin RJ, Della-Fera MA, Hartzell DL, Baile CA. TNFalpha induces and insulin inhibits caspase 3-dependent adipocyte apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 Jun 29;284(5):1176-83.

Qian H, Hausman DB, Compton MM, Martin RJ, Della-Fera MA, Hartzell DL, Baile CA. TNFalpha induces and insulin inhibits caspase 3-dependent adipocyte apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 Jun 29;284(5):1176-83.

Qian H, Hausman GJ, Compton MM, Azain MJ, Hartzell DL, Baile CA. Down-regulation of CCAAT/enhancer binding proteins alpha, beta and delta in adipose tissue by intracerebroventricular leptin in rats. *Biochim Biophys Acta*. 1998 Nov 8;1442(2-3):245-51.

Raclot T, Dauzats M, Langin D. Regulation of hormone-sensitive lipase expression by glucose in 3T3-F442A adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998 Apr 17;245(2):510-3.

Ravelli GP, Stein ZA, Susser MW. Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. *N Engl J Med.* 1976 Aug 12;295(7):349-53

Remesar X, Fernandez-Lopez JA, Alemany M. Steroid hormones and the control of body weight. *Med Res Rev.* 1993 Sep;13(5):623-31.

Remesar X, Fernandez-Lopez JA, Blay MT, Savall P, Salas A, Diaz-Silva M, Esteve M, Grasa MM, Alemany M. Effect of oral oleoyl-estrone on adipose tissue composition in male rats. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2002 Aug;26(8):1092-102.

Remesar X, Guijarro P, Torregrosa C, Grasa MM, Lopez J, Fernandez-Lopez JA, Alemany M. Oral oleoyl-estrone induces the rapid loss of body fat in Zucker lean rats fed a hyperlipidic diet. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2000 Nov;24(11):1405-12.

Remesar X, Tang V, Ferrer E, Torregrosa C, Virgili J, Masanes RM, Fernandez-Lopez JA, Alemany M. Estrone in food: a factor influencing the development of obesity? *Eur J Nutr.* 1999 Oct;38(5):247-53.

Ricquier D, Bouillaud F. Mitochondrial uncoupling proteins: from mitochondria to the regulation of energy balance. *J Physiol.* 2000 Nov 15;529 Pt 1:3-10.

Ricquier D. Respiration uncoupling and metabolism in the control of energy expenditure. *Proc Nutr Soc.* 2005 Feb;64(1):47-52.

Rodriguez J, Lazebnik Y. Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev.* 1999 Dec 15;13(24):3179-84.

Rolls BJ. The role of energy density in the overconsumption of fat. *J Nutr.* 2000 Feb;130(2S Suppl):268S-271S.

Ross MG, Desai M. Gestational programming: population survival effects of drought and famine during pregnancy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005 Jan;288(1):R25-33.

Rossi M, Kim MS, Morgan DG, Small CJ, Edwards CM, Sunter D, Abusnana S, Goldstone AP, Russell SH, Stanley SA, Smith DM, Yagaloff K, Ghatei MA, Bloom SR. A C-terminal fragment of Agouti-related protein increases feeding and antagonizes the effect of alpha-melanocyte stimulating hormone in vivo. *Endocrinology.* 1998 Oct;139(10):4428-31

Rothwell NJ, Stock MJ. Acute effects of fat and carbohydrate on metabolic rate in normal, cold-acclimated and lean and obese (fa/fa) Zucker rats. *Metabolism*. 1983 Apr;32(4):371-6.

Ruan H, Lodish HF. Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects of tumor necrosis factor-alpha. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2003 Oct;14(5):447-55. Review.

Ryden M, Dicker A, van Harmelen V, Hauner H, Brunnberg M, Perbeck L, Lonnqvist F, Arner P. Mapping of early signaling events in tumor necrosis factor-alpha -mediated lipolysis in human fat cells. *J Biol Chem*. 2002 Jan 11;277(2):1085-91. Epub 2001 Nov 1.

Sakata I, Nakamura K, Yamazaki M, Matsubara M, Hayashi Y, Kangawa K, Sakai T. Ghrelin-producing cells exist as two types of cells, closed- and opened-type cells, in the rat gastrointestinal tract. *Peptides*. 2002 Mar;23(3):531-6.

Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, Williams SC, Richardson JA, Kozlowski GP, Wilson S, Arch JR, Buckingham RE, Haynes AC, Carr SA, Annan RS, McNulty DE, Liu WS, Terrett JA, Elshourbagy NA, Bergsma DJ, Yanagisawa M. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell*. 1998 Feb 20;92(4):573-85.

Sanacora G, Kershaw M, Finkelstein JA, White JD. Increased hypothalamic content of preproneuropeptide Y messenger ribonucleic acid in genetically obese Zucker rats and its regulation by food deprivation. *Endocrinology*. 1990 Aug;127(2):730-7

Sanchis D, Adan C, Ardevol A, Del Mar Grasa M, Cabot C, Balada F, Vila R, Estruch J, Puerta M, Fernandez-Lopez JA, Remesar X, Alemany M. Short-term treatment with oleoyl-estrone in liposomes (Merlin-2) strongly reduces the expression of the ob gene in young rats. *Biochem J*. 1997b Sep 1;326 ( Pt 2):357-60.

Sanchis D, Balada F, del Mar Grasa M, Virgili J, Peinado J, Monserrat C, Fernandez-Lopez JA, Remesar X, Alemany M. Oleoyl-estrone induces the loss of body fat in rats. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1996 Jun;20(6):588-94

Sanchis D, Balada F, Farrerons C, Virgili J, del Mar Grasa M, Adan C, Esteve M, Cabot C, Ardevol A, Vila R, Fernandez-Lopez JA, Remesar X, Alemany M. Structural determinants of oleoyl-estrone slimming effects. *Life Sci*. 1998;62(15):1349-59.

Sanchis D, Balada F, Grasa MM, Virgili J, Monserrat C, Fernandez-Lopez JA, Remesar X, Alemany M. Rats receiving the slimming agent oleoyl-estrone in liposomes (Merlin-2) decrease food intake but maintain thermogenesis. *Arch Physiol Biochem*. 1997a Dec;105(7):663-72.

Sanchis D, Balada F, Grasa MM, Virgili J, Monserrat C, Fernandez-Lopez JA, Remesar X, Alemany M. Short-term handling of the slimming agent oleoyl-estrone in liposomes (Merlin-2) by the rat. *Mol Cell Biochem.* 1997c Dec;177(1-2):153-7.

Savill J, Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature.* 2000 Oct 12;407(6805):784-8. Review

Scharf MT, Ahima RS. Gut peptides and other regulators in obesity. *Semin Liver Dis.* 2004 Nov;24(4):335-47.

Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem.* 1995 Nov 10;270(45):26746-9.

Schioth HB, Muceniece R, Larsson M, Wikberg JE. The melanocortin 1, 3, 4 or 5 receptors do not have a binding epitope for ACTH beyond the sequence of alpha-MSH. *J Endocrinol.* 1997 Oct;155(1):73-8.

Schwartz MW, Figlewicz DP, Baskin DG, Woods SC, Porte D Jr. Insulin in the brain: a hormonal regulator of energy balance. *Endocr Rev.* 1992 Aug;13(3):387-414.

Schwartz MW, Sipols AJ, Marks JL, Sanacora G, White JD, Scheurink A, Kahn SE, Baskin DG, Woods SC, Figlewicz DP, et al. Inhibition of hypothalamic neuropeptide Y gene expression by insulin. *Endocrinology.* 1992b Jun;130(6):3608-16.

Schwartz MW, Woods SC, Porte D Jr, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature.* 2000 Apr 6;404(6778):661-71

Sell H, Deshaies Y, Richard D. The brown adipocyte: update on its metabolic role. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004 Nov;36(11):2098-104.

Shibata R, Ouchi N, Kihara S, Sato K, Funahashi T, Walsh K. Adiponectin stimulates angiogenesis in response to tissue ischemia through stimulation of amp-activated protein kinase signaling. *J Biol Chem.* 2004 Jul 2;279(27):28670-4. Epub 2004 Apr 28.

Shimizu H, Shargill NS, Bray GA, Yen TT, Gesellchen PD. Effects of MSH on food intake, body weight and coat color of the yellow obese mouse. *Life Sci.* 1989;45(6):543-52.

Shimokawa T, Kumar MV, Lane MD. Effect of a fatty acid synthase inhibitor on food intake and expression of hypothalamic neuropeptides. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Jan 8;99(1):66-71.

Shrago E, Glennon JA, Gordon ES. Comparative aspects of lipogenesis in mammalian tissues. *Metabolism.* 1971 Jan;20(1):54-62.

Siiteri PK. Adipose tissue as a source of hormones. *Am J Clin Nutr.* 1987 Jan;45(1 Suppl):277-82.

Simpson MA, LiCata VJ, Ribarik Coe N, Bernlohr DA. Biochemical and biophysical analysis of the intracellular lipid binding proteins of adipocytes. *Mol Cell Biochem.* 1999 Feb;192(1-2):33-40

Sipols AJ, Baskin DG, Schwartz MW. Effect of intracerebroventricular insulin infusion on diabetic hyperphagia and hypothalamic neuropeptide gene expression. *Diabetes.* 1995 Feb;44(2):147-51.

Sjovall J. Fifty years with bile acids and steroids in health and disease. *Lipids.* 2004 Aug;39(8):703-22.

Skofitsch G, Jacobowitz DM, Zamir N. Immunohistochemical localization of a melanin concentrating hormone-like peptide in the rat brain. *Brain Res Bull.* 1985 Dec;15(6):635-49.

Slavin BG, Ballard KW. Morphological studies on the adrenergic innervation of white adipose tissue. *Anat Rec.* 1978 Jul;191(3):377-89.

Slavin BG, Ong JM, Kern PA. Hormonal regulation of hormone-sensitive lipase activity and mRNA levels in isolated rat adipocytes. *J Lipid Res.* 1994 Sep;35(9):1535-41.

Small CJ, Liu YL, Stanley SA, Connoley IP, Kennedy A, Stock MJ, Bloom SR. Chronic CNS administration of Agouti-related protein (Agrp) reduces energy expenditure. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2003 Apr;27(4):530-3.

Smith S, Witkowski A, Joshi AK. Structural and functional organization of the animal fatty acid synthase. *Prog Lipid Res.* 2003 Jul;42(4):289-317.

Soontjens CD, Rafter JJ, Gustafsson JA. Ligands for orphan receptors? *J Endocrinol.* 1996 Sep;150 Suppl:S241-57.

Soukas A, Cohen P, Socci ND, Friedman JM. Leptin-specific patterns of gene expression in white adipose tissue. *Genes Dev.* 2000 Apr 15;14(8):963-80.

Stanley BG, Kyrkouli SE, Lampert S, Leibowitz SF. Neuropeptide Y chronically injected into the hypothalamus: a powerful neurochemical inducer of hyperphagia and obesity. *Peptides.* 1986 Nov-Dec;7(6):1189-92.

Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science.* 1995 Mar 10;267(5203):1445-9. Review.

Stephens JM, Pekala PH. Transcriptional repression of the C/EBP-alpha and GLUT4 genes in 3T3-L1 adipocytes by tumor necrosis factor-alpha. Regulation is coordinate and independent of protein synthesis. *J Biol Chem.* 1992 Jul 5;267(19):13580-4.

Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem.* 2000;69:217-45. Review.



Sumida M, Sekiya K, Okuda H, Tanaka Y, Shiosaka T. Inhibitory effect of tumor necrosis factor on gene expression of hormone sensitive lipase in 3T3-L1 adipocytes. *J Biochem (Tokyo)*. 1990 Jan;107(1):1-2.

Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*. 1999 Feb 4;397(6718):441-6.

Sztalryd C, Xu G, Dorward H, Tansey JT, Contreras JA, Kimmel AR, Londos C. Perilipin A is essential for the translocation of hormone-sensitive lipase during lipolytic activation. *J Cell Biol*. 2003 Jun 23;161(6):1093-103

Tacke PJ, Hofker MH, Havekes LM, van Dijk KW. Living up to a name: the role of the VLDL receptor in lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol*. 2001 Jun;12(3):275-9.

Tajima D, Masaki T, Hidaka S, Kakuma T, Sakata T, Yoshimatsu H. Acute central infusion of leptin modulates fatty acid mobilization by affecting lipolysis and mRNA expression for uncoupling proteins. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2005 Mar;230(3):200-6

Tansey JT, Huml AM, Vogt R, Davis KE, Jones JM, Fraser KA, Brasaemle DL, Kimmel AR, Londos C. Functional studies on native and mutated forms of perilipins. A role in protein kinase A-mediated lipolysis of triacylglycerols. *J Biol Chem*. 2003 Mar 7;278(10):8401-6. Epub 2002 Dec 10.

Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, Muir C, Sanker S, Moriarty A, Moore KJ, Smutko JS, Mays GG, Wool EA, Monroe CA, Tepper RI. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell*. 1995 Dec 29;83(7):1263-71.

Tatemoto K, Rokaeus A, Jornvall H, McDonald TJ, Mutt V. Galanin - a novel biologically active peptide from porcine intestine. *FEBS Lett*. 1983 Nov 28;164(1):124-8.

Tempel DL, Leibowitz KJ, Leibowitz SF. Effects of PVN galanin on macronutrient selection. *Peptides*. 1988 Mar-Apr;9(2):309-14.

Tholpady SS, Aojanepong C, Llull R, Jeong JH, Mason AC, Futrell JW, Ogle RC, Katz AJ. The cellular plasticity of human adipocytes. *Ann Plast Surg*. 2005 Jun;54(6):651-6.

Thomas DR. Weight loss in older adults. *Rev Endocr Metab Disord*. 2005 May;6(2):129-36

Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*. 1995 Mar 10;267(5203):1456-62. Review.

Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science*. 1998 Aug 28;281(5381):1312-6. Review.

Thorsell A, Heilig M. Diverse functions of neuropeptide Y revealed using genetically modified animals. *Neuropeptides*. 2002 Apr-Jun;36(2-3):182-93.

Tontonoz P, Graves RA, Budavari AI, Erdjument-Bromage H, Lui M, Hu E, Tempst P, Spiegelman BM. Adipocyte-specific transcription factor ARF6 is a heterodimeric complex of two nuclear hormone receptors, PPAR gamma and RXR alpha. *Nucleic Acids Res*. 1994 Dec 25;22(25):5628-34.

Tremblay A, Despres JP, Theriault G, Fournier G, Bouchard C. Overfeeding and energy expenditure in humans. *Am J Clin Nutr*. 1992 Nov;56(5):857-62.

Tschop M, Smiley DL, Heiman ML. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature*. 2000 Oct 19;407(6806):908-13.

Tschop M, Wawarta R, Riepl RL, Friedrich S, Bidlingmaier M, Landgraf R, Folwaczny C. Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. *J Endocrinol Invest*. 2001 Jun;24(6):RC19-21.

Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC, Croce CM. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science*. 1984 Nov 30;226(4678):1097-9.

Tsujimoto Y, Shimizu S. Bcl-2 family: life-or-death switch. *FEBS Lett*. 2000 Jan 21;466(1):6-10.

Turton MD, O'Shea D, Gunn I, Beak SA, Edwards CM, Meeran K, Choi SJ, Taylor GM, Heath MM, Lambert PD, Wilding JP, Smith DM, Ghatei MA, Herbert J, Bloom SR. A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding. *Nature*. 1996 Jan 4;379(6560):69-72.

Usiskin KS, Butterworth S, Clore JN, Arad Y, Ginsberg HN, Blackard WG, Nestler JE. Lack of effect of dehydroepiandrosterone in obese men. *Int J Obes*. 1990 May;14(5):457-63.

Vale W, Spiess J, Rivier C, Rivier J. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science*. 1981 Sep 18;213(4514):1394-7.

Vaux DL, Cory S, Adams JM. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*. 1988 Sep 29;335(6189):440-2.

Vega GL Obesity and the metabolic syndrome. *Minerva Endocrinol*. 2004 Jun;29(2):47-54.

Vicentic A, Lakatos A, Kuhar MJ. CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) peptide receptors: specific binding in AtT20 cells. *Eur J Pharmacol.* 2005 Dec 28;528(1-3):188-9.

Vila R, Adan C, Grasa MM, Masanes RM, Esteve M, Cabot C, Fernandez-Lopez JA, Remesar X, Alemany M. Effect of food deprivation on rat plasma estrone fatty acid esters. *Diabetes Obes Metab.* 1999 Nov;1(6):353-6.

Virgili J, Casals I, Peinado-Onsurbe J, Esteve M, Julve-Gil J, Fernandez-Lopez JA, Remesar X, Alemany M. Distribution of oleoyl-estrone in rat plasma lipoproteins. *Horm Metab Res.* 1999 Nov;31(11):597-601.

Vrang N, Larsen PJ, Tang-Christensen M, Larsen LK, Kristensen P. Hypothalamic cocaine-amphetamine regulated transcript (CART) is regulated by glucocorticoids. *Brain Res.* 2003 Mar 7;965(1-2):45-50.

Wajchenberg BL. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev.* 2000 Dec;21(6):697-738. Review.

Walters MR. Steroid hormone receptors and the nucleus. *Endocr Rev.* 1985 Fall;6(4):512-43. Review.

Wang C, Billington CJ, Levine AS, Kotz CM. Effect of CART in the hypothalamic paraventricular nucleus on feeding and uncoupling protein gene expression. *Neuroreport.* 2000 Sep 28;11(14):3251-5.

Wang J, Leibowitz KL. Central insulin inhibits hypothalamic galanin and neuropeptide Y gene expression and peptide release in intact rats. *Brain Res.* 1997 Nov 28;777(1-2):231-6.

Wang J, Lobito AA, Shen F, Hornung F, Winoto A, Lenardo MJ. Inhibition of Fas-mediated apoptosis by the B cell antigen receptor through c-FLIP. *Eur J Immunol.* 2000 Jan;30(1):155-63.

Wang MY, Lee Y, Unger RH. Novel form of lipolysis induced by leptin. *J Biol Chem.* 1999 Jun 18;274(25):17541-4.

Wang MY, Lee Y, Unger RH. Novel form of lipolysis induced by leptin. *J Biol Chem.* 1999 Jun 18;274(25):17541-4.

Wank SA, Pisegna JR, de Weerth A. Brain and gastrointestinal cholecystokinin receptor family: structure and functional expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Sep 15;89(18):8691-5.

Warne JP. Tumour necrosis factor alpha: a key regulator of adipose tissue mass. *J Endocrinol*. 2003 Jun;177(3):351-5. Review.

Weigle DS. Appetite and the regulation of body composition. *FASEB J*. 1994. 8:302-10

Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*. 2003 Dec;112(12):1796-808.

Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE, Tataranni PA. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001 May;86(5):1930-5.

Whigham LD, Israel BA, Atkinson RL. Adipogenic potential of multiple human adenoviruses in vivo and in vitro in animals. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2006 Jan;290(1):R190-4. Epub 2005 Sep 15

Whitnall MH. Regulation of the hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurosecretory system. *Prog Neurobiol*. 1993 May;40(5):573-629. Review.

Winter A, Breit S, Parsch D, Benz K, Steck E, Hauner H, Weber RM, Ewerbeck V, Richter W. Cartilage-like gene expression in differentiated human stem cell spheroids: a comparison of bone marrow-derived and adipose tissue-derived stromal cells. *Arthritis Rheum*. 2003 Feb;48(2):418-29.

Wolter KG, Hsu YT, Smith CL, Nechushtan A, Xi XG, Youle RJ. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol*. 1997 Dec 1;139(5):1281-92.

Woods MW, Vlahakis G. Immediate effects of insulin and anti-insulins on glycolysis in spontaneous mammary tumors in mice. *J Natl Cancer Inst*. 1974 Feb;52(2):579-82.

Woods SC, Lotter EC, McKay LD, Porte D Jr. Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons. *Nature*. 1979 Nov 29;282(5738):503-5.

Woods SC, Seeley RJ, Baskin DG, Schwartz MW. Insulin and the blood-brain barrier. *Curr Pharm Des*. 2003;9(10):795-800.

Woods SC, Seeley RJ. Insulin as an adiposity signal. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2001 Dec;25 Suppl 5:S35-8

Wortley KE, Anderson KD, Garcia K, Murray JD, Malinova L, Liu R, Moncrieffe M, Thabet K, Cox HJ, Yancopoulos GD, Wiegand SJ, Sleeman MW. Genetic deletion of ghrelin does not decrease food intake but influences metabolic fuel preference. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 May 25;101(21):8227-32.

Wortley KE, Chang GQ, Davydova Z, Fried SK, Leibowitz SF. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript in the arcuate nucleus stimulates lipid metabolism to control body fat accrual on a high-fat diet. *Regul Pept.* 2004 Feb 15;117(2):89-99.

Wynne K, Stanley S, McGowan B, Bloom S. Appetite control. *J Endocrinol.* 2005 Feb;184(2):291-318.

Wynne K, Stanley S, McGowan B, Bloom S. Appetite control. *J Endocrinol.* 2005 Feb;184(2):291-318.

Xing H, Northrop JP, Grove JR, Kilpatrick KE, Su JL, Ringold GM. TNF alpha-mediated inhibition and reversal of adipocyte differentiation is accompanied by suppressed expression of PPARgamma without effects on Pref-1 expression. *Endocrinology.* 1997 Jul;138(7):2776-83.

Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA, Chen H. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest.* 2003 Dec;112(12):1821-30.

Xu H, Sethi JK, Hotamisligil GS. Transmembrane tumor necrosis factor (TNF)-alpha inhibits adipocyte differentiation by selectively activating TNF receptor 1. *J Biol Chem.* 1999 Sep 10;274(37):26287-95.

Yamauchi T, Kadowaki T. The molecular mechanisms by which PPAR gamma/RXR inhibitors improve insulin resistance *Nippon Rinsho.* 2001 Nov;59(11):2245-54. Review.

Yaswen L, Diehl N, Brennan MB, Hochgeschwender U. Obesity in the mouse model of pro-opiomelanocortin deficiency responds to peripheral melanocortin. *Nat Med.* 1999 Sep;5(9):1066-70.

Yeaman SJ. Hormone-sensitive lipase - new roles for an old enzyme. *Biochem J.* 2004 Apr 1;379(Pt 1):11-22.

Yin D, Clarke SD, Peters JL, Etherton TD. Somatotropin-dependent decrease in fatty acid synthase mRNA abundance in 3T3-F442A adipocytes is the result of a decrease in both gene transcription and mRNA stability. *Biochem J.* 1998 May 1;331 ( Pt 3):815-20.

Yoshida H, Kong YY, Yoshida R, Elia AJ, Hakem A, Hakem R, Penninger JM, Mak TW. Apaf1 is required for mitochondrial pathways of apoptosis and brain development. *Cell.* 1998 Sep 18;94(6):739-50.

Yubero P, Masanes RM, Fernandez-Lopez JA, Remesar X, Alemany M. Modulation of muscle UCP expression by oleoyl-estrone in the rat. *J Physiol Biochem.* 2001 Sep;57(3):289-90.

Zakrzewska KE, Cusin I, Sainsbury A, Rohner-Jeanrenaud F, Jeanrenaud B. Glucocorticoids as counterregulatory hormones of leptin: toward an understanding of leptin resistance. *Diabetes*. 1997 Apr;46(4):717-9.

Zarjevski N, Cusin I, Vettor R, Rohner-Jeanrenaud F, Jeanrenaud B. Chronic intracerebroventricular neuropeptide-Y administration to normal rats mimics hormonal and metabolic changes of obesity. *Endocrinology*. 1993 Oct;133(4):1753-8. Related Articles, Links

Zhang HH, Halbleib M, Ahmad F, Manganiello VC, Greenberg AS. Tumor necrosis factor-alpha stimulates lipolysis in differentiated human adipocytes through activation of extracellular signal-related kinase and elevation of intracellular cAMP. *Diabetes*. 2002 Oct;51(10):2929-35.

Zhang HH, Kumar S, Barnett AH, Eggo MC. Dexamethasone inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis and interleukin-1 beta release in human subcutaneous adipocytes and preadipocytes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001 Jun;86(6):2817-25.

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1994 Dec 1;372(6505):425-32. Erratum in: *Nature* 1995 Mar 30;374(6521):479.

Ziotopoulou M, Erani DM, Hileman SM, Bjorbaek C, Mantzoros CS. Unlike leptin, ciliary neurotrophic factor does not reverse the starvation-induced changes of serum corticosterone and hypothalamic neuropeptide levels but induces expression of hypothalamic inhibitors of leptin signaling. *Diabetes*. 2000 Nov;49(11):1890-6.

Zong WX, Li C, Hatzivassiliou G, Lindsten T, Yu QC, Yuan J, Thompson CB. Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis. *J Cell Biol*. 2003 Jul 7;162(1):59-69.

Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001 Apr;7(2):211-28

## **VIII. ANNEX PUBLICACIONES**





## Rats treated with oleoyl-oestrone maintain glucidic homeostasis: comparisons with a pair-fed model

Anna Salas, Montserrat Esteve, M. Mar Grasa and Xavier Remesar\*

Department de Nutrició i Bromatologia, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal, 645, 08028 Barcelona, Spain

(Received 12 November 2004 – Revised 9 June 2005 – Accepted 13 June 2005)

To determine whether or not the weight (and fat) loss induced by oleoyl-oestrone treatment results only as a consequence of decreased food intake, we compared treated animals with a pair-fed model. To this end, Wistar female rats received daily oral gavages of 10 µmol/kg per d oleoyl-oestrone in sunflower oil, or vehicle alone for 10 or 20 d. A second group of rats received the gavage of sunflower oil and the same amount of food ingested as the oleoyl-oestrone-treated animals (pair-fed group). Rats treated with oleoyl-oestrone maintained glucidic metabolism homeostasis despite a marked decrease in adipose tissue weight ( $P < 0.001$ ). Pair-fed rats exhibited a different pattern, comparable to short-term starvation, with greatly decreased glycogen stores ( $P < 0.0001$ ). The most significant effects were detected in the 10 d period groups. Oleoyl-oestrone affected the activity of the ponderostat system not only by decreasing appetite but also by modifying energy partition: treated animals maintained their glucose and energy homeostasis despite decreased food intake and the massive depletion of lipid stores.

### Oleoyl-oestrone: Body weight: Pair-fed

Oleoyl-oestrone (OE) is synthesized from oestrone by adipose cells (Esteve *et al.* 2001) and released into the bloodstream, where its concentrations correlate with body fat mass (Fernández-Real *et al.* 1999; Cabot *et al.* 2000). As its experimental administration results in the loss of body fat, without concurrent loss of body protein (Sanchis *et al.* 1996; Grasa *et al.* 2001), OE has been postulated as a lipostatic signal regulating body fat mass. The intravenous administration of pharmacological doses of OE causes mild oestrogenic effects, and results in high circulating levels of oestrone (Cabot *et al.* 2001). Oral administration of the oestrone ester, however, precludes these effects by maintaining low plasma levels of both oestrone and oestradiol (Cabot *et al.* 2001). The decrease in food intake induced by OE is very sharp in the first 2 d of treatment, but rapidly recovers thereafter; this contrasts with the pattern observed for body weight, which maintains a gap in relation to controls a long time after treatment has ceased (Adán *et al.* 1999).

Although the mechanism underlying OE action remains unknown, it may involve pathways other than those activated by starvation. Thus, chronic food restriction leads to a decrease in body weight, resulting from a marked increase in lipid mobilization (Comizio *et al.* 1998) that contrasts with the pattern seen in short-term starvation, with limited lipolysis and rapid utilization of glycogen stores, inducing a dramatic decrease in liver weight (Palou *et al.* 1981). The present study was designed to establish whether or not the effects of OE on the intermediate metabolism were simply a consequence of decreased food intake. Thus, we compared OE-treated female rats over a period of either 10 or 20 d with rats that were fed the same amount of food as that consumed by the treated rats (pair-fed, PF).

### Materials and methods

Wistar female rats (Harlan-Interfauna Ibérica, Sant Feliu de Codines, Spain) weighing initially 220–230 g were housed in individual cages under a light cycle (on from 08.00 to 20.00 hours) and in a temperature-controlled environment (20–22°C). Food (standard rat chow pellets; Panlab, Barcelona, Spain) and water were provided in excess at all times, except for PF groups. Food consumption was measured daily and used to compute the mean energy intake of the animals in each group based on the energy content of the rat chow (digestible energy: 13.26 MJ/kg).

All procedures were in accordance with the guidelines for the use of experimental animals established by the European Union, Spain and Catalonia, and were approved by the Animal Handling Ethics Committee of the University of Barcelona.

Rats were randomly divided into two groups: one group was treated for 10 d and the other for 20 d. Each group was further sub-divided into three groups (six rats per group) depending on treatment: one group received a daily intra-gastric gavage of 0.2 ml sunflower oil containing 10 µmol OE (OED SL, Barcelona, Spain) per kg rat weight (OE-treated group); the other two groups received only the intra-gastric gavages of sunflower oil, the first fed *ad libitum* (control group), the second having its food access limited to amounts consumed by the OE-treated animals (PF group).

On day 10 (or 20), and at the beginning of the light cycle, rats were killed by decapitation and blood was recovered in plastic beakers. Serum was separated and frozen for analysis. The liver,

pieces of white adipose tissue (WAT) from different locations (periovaric, retroperitoneal), interscapular brown adipose tissue and gastrocnemius, tibialis, soleus and extensor digitorum longus muscles were immediately excised, frozen in liquid N and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . All tissue samples were weighed before use.

Lipid content of liver and gastrocnemius muscle samples were extracted with trichloromethane-methanol (2:1), dried and subjected to direct weighing (Folch *et al.* 1957). Tissue samples were used for glycogen determination as glycosyl residues (Serafini & Alemany, 1987). DNA content was measured in WAT samples using a standard fluorimetric method with 3,5-diaminobenzoic acid (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) and bovine thymus DNA as a standard (Remesar *et al.* 2002). Since all cell nuclei contain the same amount of DNA (about  $6\mu\text{g}$  per million cells), we could estimate the approximate number of cells in a given WAT site by dividing its DNA content by the mean DNA content of a cell ( $6\text{pg/cell}$ ). The mean mass of the cells in a given WAT site was determined by dividing the weight of the tissue by the number of cells it contained (Her *et al.* 1973; Remesar *et al.* 2002).

Serum was used to measure glucose (kit from Sigma), triacylglycerols (kit from Biosystems, Barcelona, Spain), NEFA (kit from Wako, Richmond, VA, USA), 3-hydroxybutyrate (kit from Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), total cholesterol (kit from Menarini, Florence, Italy), HDL-cholesterol (kits from Randox, Crumlin, UK and from Menarini), insulin (sensitive rat insulin RIA kit from Linco, St Louis, MO, USA), leptin (rat insulin RIA kit from Linco), acyl-oestrone (Ardévol *et al.* 1997; Estrone RIA; DSL, Webster, TX, USA) and adiponectin (mouse adiponectin kit from Linco).

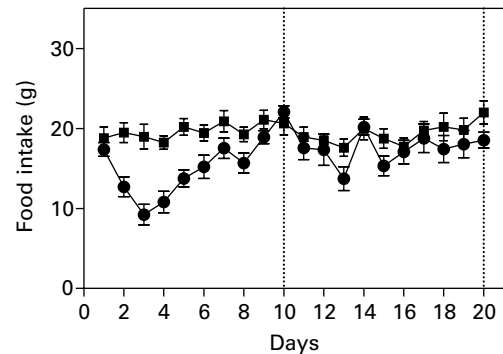
Prism 4 program was utilized for statistical analysis (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Two-way ANOVA was employed either to compare all experimental groups or to compare only the OE and PF groups. *Post hoc* Bonferroni tests were used to establish the differences between groups. The  $\alpha$  level for *post hoc* comparisons was 0.95.

## Results

Rats treated with OE exhibited markedly decreased food intake during the first 4 d of treatment (Fig. 1); they subsequently recovered to control levels on day 10. OE-treated animals ate a mean of 163 (SEM 8.4) g over 10 d compared with 196 (SEM 7.11) g consumed by control rats. The intake differences between OE and PF groups *v.* control group were significant only during the first 5 d of treatment. Between days 10 and 20 the control group consumed 193 (SEM 8.11) g while the OE and PF groups ate 169 (SEM 11.1) g.

Fig. 2 displays the changes in body weight during the period studied. The OE group exhibited significantly lower body weight than the PF group during treatment. Thus, there is an initial decrease in body weight in both the OE and PF groups, with the lowest values occurring on day 4, followed by a partial recovery running parallel with the control group; however, this gap is maintained until the end of the study. It should be noted that the recovery for the PF group tended to be faster than that of OE-treated rats.

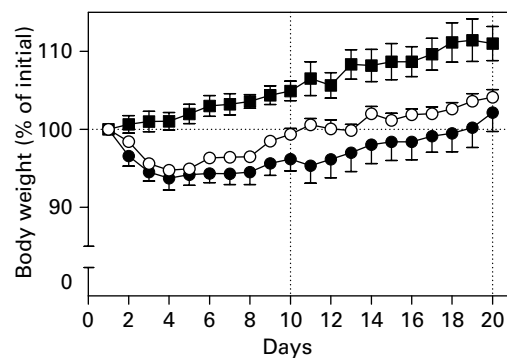
Table 1 demonstrates that the serum levels of glucose, NEFA, 3-hydroxybutyrate and triacylglycerols were not affected by OE, regardless of the experiment's duration. The control and OE groups differed only in total cholesterol and HDL-cholesterol



**Fig. 1.** Changes in food intake of Wistar female rats after 10 or 20 d of daily gavages of sunflower oil (control group, ■) or  $10\mu\text{mol/kg}$  oleoyl-oestrone (OE)/pair-fed (PF) group (●). PF rats were fed the same amount of food as the OE-treated group. For details of procedures, see p. 738. Values are the means (of six to twelve different animals) with their standard errors depicted by vertical bars. Significance of the differences between groups (two-way ANOVA): effect of time  $P < 0.0001$ ; effect of treatment  $P < 0.0001$ . Bonferroni post-test: control and OE-treated values were different on days 2 and 5 ( $P < 0.05$ ), as well as on days 3 and 4 ( $P < 0.001$ ). There were no differences between OE-treated and PF groups.

levels, proving particularly low in the OE group; conversely, the PF group showed significantly increased levels of lipid metabolites on day 10, although this was not maintained on day 20, when only a decrease in glucose and urea and an increase in 3-hydroxybutyrate were recorded. Direct comparison of the OE and PF groups uncovered significant differences in urea, triacylglycerols, NEFA, 3-hydroxybutyrate, cholesterol and HDL-cholesterol.

Serum hormone levels revealed important differences between treated groups and controls, as can be seen in Table 2. On day 10, OE-treated rats exhibited lower insulin and leptin levels, and higher acyl-oestrone levels than did controls, these differences remaining intact on day 20 in the case of leptin. The PF group displayed lower leptin and insulin and higher adiponectin levels on day 10 than did controls, the differences in leptin and insulin



**Fig. 2.** Changes in body weight, expressed as the percentage of initial body weight, of Wistar female rats after 10 or 20 d of daily gavages of sunflower oil (control group, ■) or  $10\mu\text{mol/kg}$  oleoyl-oestrone (OE) (●) and the pair-fed (PF) group (○). For details of procedures, see p. 738. Values are the means (of six to twelve different animals) with their standard errors depicted by vertical bars. Significance of the differences between groups (two-way ANOVA): effect of time  $P < 0.0001$ ; effect of treatment  $P < 0.0001$ . Bonferroni post-test: control and OE-treated values were different from day 3 of treatment ( $P < 0.05$ ). Two-way ANOVA restricted to OE-treated and PF groups showed significant effects on both time ( $P < 0.0001$ ) and treatment ( $P < 0.0003$ ), without any interaction ( $P = 0.9056$ ) or differences at any point when the Bonferroni test was applied.

**Table 1.** Serum metabolite levels of Wistar female rats after 10 or 20 d of treatment\*  
(Mean values with their standard errors for six animals per group)

Parameter	10 d						20 d						Pt		
	Control		OE-treated		PF		Control		OE-treated		PF				
	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM			
Glucose (mm)	5.74 <sup>a</sup>	0.08	5.55 <sup>a</sup>	0.11	5.68 <sup>a</sup>	0.13	6.17 <sup>a</sup>	0.30	5.71 <sup>a</sup>	0.10	5.29 <sup>b</sup>	0.10	0.6221	0.0209	0.1291
Urea (mm)	5.00 <sup>a</sup>	0.38	5.50 <sup>a</sup>	0.49	4.67 <sup>a</sup>	0.26	5.99 <sup>a</sup>	0.47	6.64 <sup>a</sup>	0.27	4.93 <sup>b</sup>	0.56	0.0282	0.0193	0.0067
Triacylglycerols (mm)	0.40 <sup>a</sup>	0.04	0.46 <sup>a</sup>	0.03	0.73 <sup>b</sup>	0.08	0.61 <sup>a</sup>	0.09	0.46 <sup>a</sup>	0.05	0.56 <sup>a</sup>	0.06	0.8083	0.0180	0.0047
NEFA (mm)	0.38 <sup>a</sup>	0.05	0.43 <sup>a</sup>	0.03	0.65 <sup>b</sup>	0.01	0.49 <sup>a</sup>	0.05	0.38 <sup>a</sup>	0.02	0.50 <sup>a</sup>	0.05	0.1856	0.0002	0.0002
3-Hydroxybutyrate (µM)	100 <sup>a</sup>	9.01	104 <sup>a</sup>	15	193 <sup>b</sup>	17	82.1 <sup>a</sup>	4.11	104 <sup>a</sup>	10.1	175 <sup>b</sup>	9.02	0.3566	< 0.0001	0.0004
Total cholesterol (mm)	1.42 <sup>a</sup>	0.11	0.69 <sup>b</sup>	0.12	1.30 <sup>a</sup>	0.08	1.21 <sup>a</sup>	0.03	0.68 <sup>b</sup>	0.11	1.19 <sup>a</sup>	0.08	0.1638	< 0.0001	< 0.0001
HDL-cholesterol (mm)	1.29 <sup>a</sup>	0.05	0.38 <sup>b</sup>	0.06	1.18 <sup>a</sup>	0.09	0.82 <sup>a</sup>	0.05	0.48 <sup>b</sup>	0.09	0.83 <sup>a</sup>	0.07	0.0004	< 0.0001	< 0.0001

OE, oleoyl-oestrone; PF, pair-fed.

<sup>a,b</sup>Mean values within a row with unlike superscript letters were significantly different (*post hoc* comparisons, Bonferroni test;  $P < 0.05$ ).

\*For details of procedures, see p. 738.

†Significance of the differences between groups (ANOVA).

**Table 2.** Plasma hormone values of Wistar female rats after 10 or 20 d of treatment\*  
(Mean values with their standard errors for six animals per group)

Parameter	10 d						20 d						Pt		
	Control		OE-treated		PF		Control		OE-treated		PF				
	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM			
Insulin (nm)	0.37 <sup>a</sup>	0.06	0.24 <sup>b</sup>	0.04	0.15 <sup>b</sup>	0.01	0.55 <sup>a</sup>	0.04	0.43 <sup>b</sup>	0.03	0.25 <sup>b</sup>	0.03	0.0002	0.0001	< 0.0001
Leptin (nm)	0.16 <sup>a</sup>	0.02	0.08 <sup>b</sup>	0.01	0.09 <sup>b</sup>	0.02	0.22 <sup>a</sup>	0.02	0.11 <sup>b</sup>	0.01	0.11 <sup>b</sup>	0.02	0.0376	0.0001	0.6824
Adiponectin (nm)	144 <sup>a</sup>	12	109 <sup>a</sup>	14	229 <sup>b</sup>	28	182 <sup>a</sup>	21	161 <sup>a</sup>	14	193 <sup>a</sup>	13	0.2184	0.0005	0.0004
Acyloestrone (nm)	147 <sup>a</sup>	7.7	222 <sup>b</sup>	17	181 <sup>ab</sup>	21	206 <sup>a</sup>	5.7	187 <sup>a</sup>	21	196 <sup>a</sup>	16	0.3176	0.183	0.3840

OE, oleoyl-oestrone; PF, pair-fed.

<sup>a,b</sup>Mean values within a row with unlike superscript letters were significantly different (*post hoc* comparisons, Bonferroni test;  $P < 0.05$ ).

\*For details of procedures, see p. 738.

†Significance of the differences between groups (ANOVA).

still maintained at day 20. Direct comparison of the OE and PF groups indicated that insulin and adiponectin levels were, in fact, different.

Table 3 depicts the absolute and relative weights of liver and different muscles. In OE-treated rats the weights of the liver and soleus, tibialis and extensorum digitorum longus muscles remained the same, but exhibited a lower gastrocnemius muscle mass than controls, on both days 10 and 20. The PF group maintained the same muscle weight values but decreased values for liver, on both days 10 and 20. As a consequence, the relative weight of the liver in PF were lower than in the control group, contrasting with the increased values displayed by the OE group on day 20. Muscles of treated groups maintained their relative values in comparison with the control group, except for gastrocnemius muscle on day 10. Direct comparison between OE and PF groups indicated that liver, gastrocnemius, tibialis and extensorum digitorum longus muscle weights were different.

Table 4 displays the absolute and relative weights of adipose tissue sites, as well as the mean cell weight and number. The OE group showed lower adipose tissue weights, significantly so both in the case of periovaric location on day 10, and for all adipose samples on day 20. This same pattern was repeated by the relative weight of tissues. The number of cells decreased in periovaric and retroperitoneal adipose tissue with OE treatment, on both days 10 and 20 of treatment. PF groups revealed a tendency toward lower adipose tissue weights, the differences being significant for retroperitoneal (due to decreased cell numbers) on day 10, as well as for all adipose samples on day 20. Direct comparison between OE and PF groups indicated that periovaric WAT weight and cell number were also different between these groups. Brown adipose tissue showed significant decreases for the PF group on days 10 and 20, whereas in the OE group this decrease was significant only on day 20.

Table 5 displays values for liver and gastrocnemius muscle lipid, protein and glycogen content. Treatment with OE did not induce changes in liver and muscle metabolite content, neither on day 10 nor day 20, except for a small increase in protein content on day 20. However, the PF group exhibited an almost complete depletion of glycogen levels, particularly on day 10, the decrease being more marked in liver than in muscle. There were significant differences in liver protein, as well as in liver and muscle glycogen content between the OE and PF groups.

## Discussion

Control rats exhibited normal growth patterns during treatment, since the extra energy provided by oil gavages represented only 3% (8.6 kJ/d) of the energy derived from rat chow (265 kJ/d). Serum hormone and metabolite levels were similar to those previously described (Grasa *et al.* 2001), with the decrease in cholesterol and HDL-cholesterol levels proving the most remarkable occurrence. The detected decreases in total cholesterol were as pronounced as previously described, being the important decrease in HDL fraction partially counterbalanced by the increased cholesterol content of other lipoproteins, mainly in the VLDL fraction (Blay *et al.* 2002).

The response of OE-treated animals in terms of body weight and food intake was the same as that described for a 10 d treatment (Grasa *et al.* 2001), implying a rapid recovery of food intake following a short period of restricted intake (about 4 d), which is not counterbalanced by a recovery in body weight.

This sequence of events had two consecutive periods: the initial 10 d, where food restriction in the OE and PF groups represented a 17% decrease in the energy ingested by controls (predominantly during the first half of the period); and a second period, wherein food restriction represented only a 13% decrease in the energy ingested by controls. It might therefore be expected that the effects of energy intake limitation should be more intense in the groups treated for 10 d than in those treated for 20 d. However, the effects induced by treatment or dietary restriction in the 10 d groups seriously affected recovery, since the partial increase in food intake between days 10 and 20 was not followed by a rapid weight recovery. As the slopes in the growth pattern were similar from day 4 onwards, the differences in body weight were maintained between treated and control groups. Loss of adipose tissue mass was the major contributing factor to weight loss, consistent with previous studies (Grasa *et al.* 2001). This is also in accordance with the role postulated for OE in modifying the ponderostat setting (Adán *et al.* 1999).

We can assume that the decrease in body weight in OE-treated rats ultimately resulted from the negative energy balance stemming from the unchanged energy expenditure (Sanchis *et al.* 1997b) combined with a decreased energy intake. This imbalance derived principally from lipid mobilization, as confirmed by adipose tissue depletions from various locations during the first half of the period. In fact, this loss was maintained during the second 10 d, despite the resumption of relatively normal food intake. Lipid mobilization persisted while maintaining normal glucose and glycogen levels, indicating that the body's response to the energy imbalance was highly selective, i.e. the retention of carbohydrate stores coupled with the mobilization of lipid resources. The tendency to increase liver glycogen levels in the OE group on day 20 is consistent with our previous reports (Sanchis *et al.* 1997a), and explains the increase in relative weight.

The decrease in adipose tissue mass in OE-treated animals was caused by a corresponding decrease in cell numbers, consistent with a predominance of apoptotic mechanisms (Troyer & Fernandes, 1996). The present results are partially in accordance with previously reported gender-specific patterns (Porter *et al.* 2004) in rats with restricted energy intake, specifically the tendency of females to maintain adipocyte volume, despite the varying sensitivities of adipose locations.

The PF group followed a different growth recovery pattern than the OE-treated group, involving more pronounced changes in liver weight (resulting from a near total depletion of glycogen and its associated water) and more pronounced than those in adipose tissue, especially during the first 10 d. This pattern continued over the second 10 d period, since low liver weight and hepatic glycogen were maintained. The scarcely detectable mobilization of adipose tissue during the first 10 d, when only the retroperitoneal location showed a significant weight loss despite the decreased cell numbers on day 20, contrasts with the pattern of OE-treated rats, and may, in fact, be consistent with the increased lipolysis observed in these groups (Grasa *et al.* 2001). The metabolic pattern followed by the PF group was similar to that induced by short-term starvation, with lower glucose levels and a dramatic decrease in liver and muscle glycogen, together with enhanced markers for lipolytic activity, i.e. the increase in NEFA and ketone bodies. Such decreases in both leptin and insulin levels support this interpretation (Rabinovitch *et al.* 1976; Baranowska *et al.* 2001), as do the increases in adiponectin levels (Zhang *et al.* 2002). Since over the last 4 d these rats ingested nearly 90% of the control intake, it

**Table 3.** Liver and muscle tissue weight and tissue relative weight (as a percentage of body weight (%bw)) in Wistar female rats after 10 or 20d of treatment\*  
(Mean values with their standard errors for six animals per group)

Parameter	Units	10d						20d						P†
		Control		OE-treated		PF		Control		OE-treated		PF		
		Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	
Liver	g	9.94 <sup>a</sup>	0.25	9.02 <sup>a</sup>	0.28	6.68 <sup>b</sup>	0.28	9.55 <sup>a</sup>	0.32	10.1 <sup>a</sup>	0.25	7.91 <sup>b</sup>	0.38	<0.0001
	%bw	3.88 <sup>a</sup>	0.11	4.03 <sup>a</sup>	0.16	2.96 <sup>b</sup>	0.02	3.74 <sup>a</sup>	0.10	4.52 <sup>b</sup>	0.09	3.30 <sup>b</sup>	0.10	<0.0001
Gastrocnemius	g	1.43 <sup>a</sup>	0.08	1.19 <sup>c</sup>	0.06	1.32 <sup>a</sup>	0.08	1.54 <sup>a</sup>	0.10	1.34 <sup>b</sup>	0.09	1.51 <sup>a</sup>	0.09	0.0059
	%bw	0.59 <sup>a</sup>	0.02	0.52 <sup>b</sup>	0.02	0.59 <sup>a</sup>	0.02	0.60 <sup>a</sup>	0.01	0.57 <sup>a</sup>	0.01	0.63 <sup>a</sup>	0.02	0.0051
Soleus	mg	101 <sup>a</sup>	9	96 <sup>a</sup>	9	104 <sup>a</sup>	11	124 <sup>a</sup>	10	127 <sup>a</sup>	10	116 <sup>a</sup>	9	0.8505
	%bw	0.042 <sup>a</sup>	0.001	0.043 <sup>a</sup>	0.003	0.046 <sup>a</sup>	0.002	0.049 <sup>a</sup>	0.002	0.055 <sup>a</sup>	0.009	0.049 <sup>a</sup>	0.002	0.7486
Extensorum digitorum longus	mg	107 <sup>a</sup>	9	101 <sup>a</sup>	10	112 <sup>a</sup>	8	125 <sup>a</sup>	10	113 <sup>a</sup>	10	130 <sup>a</sup>	11	0.0045
	%bw	0.044 <sup>a</sup>	0.002	0.041 <sup>a</sup>	0.006	0.050 <sup>a</sup>	0.001	0.049 <sup>a</sup>	0.003	0.048 <sup>a</sup>	0.002	0.054 <sup>a</sup>	0.003	0.0144
Tibialis	mg	468 <sup>a</sup>	12	421 <sup>a</sup>	14	457 <sup>a</sup>	13	511 <sup>a</sup>	18	445 <sup>a</sup>	15	512 <sup>a</sup>	7	0.0386
	%bw	0.19 <sup>a</sup>	0.004	0.18 <sup>a</sup>	0.02	0.20 <sup>a</sup>	0.005	0.20 <sup>a</sup>	0.005	0.19 <sup>a</sup>	0.007	0.21 <sup>a</sup>	0.005	0.0691

OE, oleoyl-olestrone; PF, pair-fed.

<sup>a,b</sup>Mean values within a row with unlike superscript letters were significantly different (*post hoc* comparisons, Bonferroni test;  $P < 0.05$ ).

\*For details of procedures, see p. 738.

†Significance of the differences between groups (ANOVA).

**Table 4.** White adipose tissue (WAT) weight, tissue relative weight (as % of body weight (%bw)), cell numbers and cell mass in Wistar female rats after 10 or 20 d of treatment\* (Mean values with their standard errors for six animals per group)

Parameter	Units	10 d						20 d						Pt		
		Control		OE-treated		PF		Control		OE-treated		PF		Time	Treatment	OE v. PF
		Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM			
Retroperitoneal WAT	g	1.73 <sup>a</sup>	0.18	1.25 <sup>a</sup>	0.21	1.37 <sup>a</sup>	0.16	2.52 <sup>a</sup>	0.21	1.35 <sup>b</sup>	0.15	1.56 <sup>b</sup>	0.15	0.0265	0.0003	0.3744
	%bw	0.78 <sup>a</sup>	0.078	0.55 <sup>a</sup>	0.086	0.61 <sup>a</sup>	0.077	0.92 <sup>a</sup>	0.119	0.73 <sup>b</sup>	0.076	0.68 <sup>b</sup>	0.075	0.0317	0.0003	0.1226
Cell number	x 10 <sup>6</sup>	144 <sup>a</sup>	16.5	83.8 <sup>b</sup>	10.2	97.6 <sup>b</sup>	12.9	143 <sup>a</sup>	10.0	79.1 <sup>b</sup>	12.1	67.1 <sup>b</sup>	13.4	0.3585	0.0001	0.9281
Cell mass	ng	12.7 <sup>a</sup>	1.10	15.2 <sup>a</sup>	1.92	15.4 <sup>a</sup>	1.89	19.3 <sup>a</sup>	2.04	18.3 <sup>a</sup>	2.67	19.9 <sup>a</sup>	2.37	0.0089	0.7215	0.6903
Periovaric WAT	g	4.69 <sup>a</sup>	0.25	2.74 <sup>b</sup>	0.21	3.54 <sup>a</sup>	0.35	5.71 <sup>a</sup>	0.45	3.02 <sup>b</sup>	0.22	3.99 <sup>b</sup>	0.33	0.0916	<0.0001	0.0242
	%bw	1.95 <sup>a</sup>	0.117	1.21 <sup>b</sup>	0.130	1.49 <sup>a</sup>	0.147	2.23 <sup>a</sup>	0.227	1.29 <sup>b</sup>	0.125	1.58 <sup>b</sup>	0.257	0.2431	<0.0001	0.0606
Cell number	x 10 <sup>6</sup>	328 <sup>a</sup>	25.8	199 <sup>b</sup>	11.8	372 <sup>a</sup>	37.1	378 <sup>a</sup>	65.8	206 <sup>b</sup>	15.4	228 <sup>b</sup>	16.6	0.3010	0.0005	0.0003
Cell mass	ng	14.9 <sup>a</sup>	1.46	12.7 <sup>a</sup>	1.78	9.85 <sup>a</sup>	1.26	16.3 <sup>a</sup>	1.66	14.8 <sup>a</sup>	0.91	16.2 <sup>a</sup>	1.78	0.0116	0.2611	0.6268
Interescapular brown adipose tissue	mg	365 <sup>a</sup>	15	308 <sup>ab</sup>	20	264 <sup>b</sup>	20	401 <sup>a</sup>	15	307 <sup>b</sup>	22	327 <sup>b</sup>	16	0.0782	0.0008	0.6179
	%bw	0.151 <sup>a</sup>	0.006	0.136 <sup>a</sup>	0.008	0.118 <sup>b</sup>	0.007	0.157 <sup>a</sup>	0.010	0.130 <sup>a</sup>	0.011	0.136 <sup>a</sup>	0.012	0.3175	0.0079	0.5135

OE, oleoyl-oestrone; PF, pair-fed.

<sup>a,b</sup>Mean values within a row with unlike superscript letters were significantly different (*post hoc* comparisons, Bonferroni test; *P* < 0.05).

\*For details of procedures, see p. 738.

<sup>†</sup>Significance of the differences between groups (ANOVA).



**Table 5.** Liver and gastrocnemius muscle metabolite content in Wistar female rats after 10 or 20 d of treatment\* (Mean values with their standard errors for six animals per group)

Parameter	10 d						20 d						OE v. PF		
	Control		OE-treated		PF		Control		OE-treated		PF				
	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM			
Liver glycogen (mg)	485 <sup>a</sup>	39.1	352 <sup>a</sup>	50.7	5.94 <sup>b</sup>	1.71	518 <sup>a</sup>	64.1	552 <sup>a</sup>	45.4	127 <sup>b</sup>	36.1	0.0055	0.0001	<0.0001
Liver lipid (mg)	332 <sup>a</sup>	19	308 <sup>a</sup>	23	296 <sup>a</sup>	13	274 <sup>a</sup>	30	275 <sup>a</sup>	32	11 <sup>a</sup>	303	0.1228	0.8773	0.7295
Liver protein (g)	1.77 <sup>a</sup>	0.13	1.64 <sup>ab</sup>	0.08	1.43 <sup>b</sup>	0.09	1.53 <sup>a</sup>	0.11	1.89 <sup>b</sup>	0.11	1.66 <sup>ab</sup>	0.21	0.2937	0.0837	0.0091
Muscle glycogen (mg)	3.06 <sup>a</sup>	0.27	3.21 <sup>a</sup>	0.44	1.42 <sup>b</sup>	0.34	3.93 <sup>a</sup>	0.63	3.43 <sup>a</sup>	0.61	2.60 <sup>a</sup>	0.78	0.0868	0.0150	0.0225
Muscle lipid (mg)	22.1 <sup>a</sup>	2.11	16.3 <sup>a</sup>	2.1	19.8 <sup>a</sup>	2.1	24.5 <sup>a</sup>	5.1	19.8 <sup>a</sup>	1.3	19.0 <sup>a</sup>	2.2	0.3098	0.0226	0.4098
Muscle protein (mg)	261 <sup>a</sup>	11	242 <sup>a</sup>	18	237 <sup>a</sup>	23	306 <sup>a</sup>	31	257 <sup>a</sup>	13	272 <sup>a</sup>	21	0.0148	0.0654	0.7461

OE, oleoyl-oestrone; PF, pair-fed.

<sup>a,b</sup>Mean values within a row with unlike superscript letters were significantly different (*post hoc* comparisons, Bonferroni test;  $P < 0.05$ ).

\*For details of procedures, see p. 738.

<sup>†</sup>Significance of the differences between groups (ANOVA).

remains difficult to attribute such dramatic changes to a simple trial of food deprivation, and a possible role of stress arising from the limitations of available food, as an intrinsic factor of a PF model, must be considered (Belda *et al.* 2005).

The restriction of food intake does not affect protein metabolism in the same way in the OE and PF groups. In OE-treated rats the stable urea levels, the maintenance (or increase on day 20) of liver protein content and the lack of relative weight changes in nearly all muscles indicate that protein was preserved and confirms the stability of this tissue, as has been previously reported (Cabot *et al.* 2000). However, the decrease of gastrocnemius muscle weight, perhaps as a consequence of slight decreases in lipid and protein contents, begs the question of whether different metabolic responses are the products of diverse fibre-type composition. The effects on the PF group are consistent with a possible loss of protein mass, similar to mechanisms underlying short-term starvation, particularly generated by liver protein, as is evident by the decrease in urea levels.

Decreases in insulin and leptin levels are not only typical of OE treatment (Adán *et al.* 1999), but are also consistent with the maintenance of energy balance at the expense of internal stores within the context of maintained internal homeostasis. However, the patterns followed by the OE-treated and PF groups, despite certain similar strategies regarding energy homeostasis, differ notably in the way glucose homeostasis was maintained: depleting glycogen in PF and decreasing its utilization in OE-treated rats. The more pronounced changes in insulin levels in PF groups, together with the increase in adiponectin levels on day 10, reinforce the different strategies employed by the OE and PF groups in managing their glucidic reserves. Moreover, the lipolytic pattern followed by the PF and OE groups is different, since the WAT weight decrease induced by OE is more pronounced than that caused by food restriction. Thus, the OE group does not display changes in plasma lipolytic markers, such as NEFA and 3-hydroxybutyrate levels, conversely to increased levels shown by the PF group, which are probably caused by an increase in hormone-sensitive lipase activity as in fast-state setting (Koopman *et al.* 1989). This fact allows us to suggest an accelerated utilization of these metabolites in the OE group that could explain the maintenance of glucidic stores.

Taken as a whole, the present findings confirm that lipid mobilization in OE-treated rats is not merely a consequence of food intake. We would furthermore suggest that treatment with OE induces certain selective changes in the control of sympathetic activity that probably induce a selective lipid mobilization without any change to glucidic homeostasis.

## Acknowledgements

This research was supported by grants 01/309 from the Fondo de Investigaciones Sanitarias/FEDER Funds from the European Union, and AGL2000-0780 from the Programa Nacional de Recursos y Tecnologías Agroalimentarias of the Government of Spain. Revision of the text by the SAL of the University of Barcelona is gratefully acknowledged.

## References

- Adán C, Cabot C, Vilà R, Grasa MM, Masanés RM, Esteve M, Estruch J, Fernández-López JA, Remesar X & Alemany M (1999) Oleoyl-oestrone treatment affects the ponderostat setting differently in lean and obese Zucker rats. *Int J Obes* **23**, 366–373.

- Ardévol A, Virgili J, Sanchis D, Adán C, Fernández-Real JM, Fernández-López JA, Remesar X & Alemany M (1997) A method for the measurement of plasma oestrone fatty ester levels. *Anal Biochem* **249**, 247–250.
- Baranowska B, Chmielowska M, Wolinska-Witort E, Roguski K & Wasilewska-Dziubinska E (2001) The relationship between neuropeptides and hormones in starvation. *Neuro Endocrinol Lett* **22**, 249–355.
- Belda X, Ons S, Carrasco J & Armario A (2005) The effects of chronic food restriction on hypothalamic-pituitary-adrenal activity depend on morning versus evening availability of food. *Pharmacol Biochem Behav* **81**, 41–46.
- Blay M, Peinado-Onsurbe J, Grasa MM, Díaz-Silva M, Fernández-López JA, Remesar X & Alemany M (2002) Effect of oral oleoyl-oestrone treatment on plasma lipoproteins and tissue lipase activities of Zucker lean and obese female rats. *Int J Obes* **26**, 618–626.
- Cabot C, Grasa MM, Masanés RM, de Matteis R, Cinti S, Fernández-López JA, Remesar X & Alemany M (2001) Oleoyl-oestrone does not have direct estrogenic effects on rats. *Life Sci* **69**, 749–761.
- Cabot C, Masanés R, Bulló M, García-Lorda P, Fernández-López JA, Salas-Salvadó J & Alemany M (2000) Plasma acyl-oestrone levels are altered in obese women. *Endocr Res* **26**, 465–476.
- Comizio R, Pietrobelli A, Tan YX, Wang Z, Withers RT, Heymsfield SB & Boozer CN (1998) Total lipid and triglyceride response to energy deficit: relevance to body composition models. *Am J Physiol* **274**, E860–E866.
- Esteve M, Savall P, Virgili J, Fernández-López JA, Remesar X & Alemany M (2001) Modulation by leptin, insulin and corticosterone of oleoyl-oestrone synthesis in cultured 3T3L1 cells. *Biosci Rep* **21**, 755–763.
- Fernández-Real JM, Sanchis D, Ricart W, Casamitjana R, Balada F, Remesar X & Alemany M (1999) Plasma oestrone-fatty acid ester levels are correlated with body fat mass in humans. *Clin Endocrinol* **50**, 253–260.
- Folch J, Lees M & Sloane-Stanley GH (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* **226**, 497–509.
- Grasa MM, Cabot C, Esteve M, Yubero P, Masanés RM, Blay MT, Vilà R, López-Martí J, Fernández-López JA, Remesar X & Alemany M (2001) Daily oral oleoyl-oestrone gavage induces a dose-dependent loss of fat in Wistar rats. *Obes Res* **9**, 202–209.
- Her PA, Hammond RP & Homolsky MW (1973) Sodium pump activity during norepinephrine-stimulated respiration in brown adipocytes. *Am J Physiol* **224**, 1300–1304.
- Koopman SJ, Sips HC, Bosman J, Radder JK & Krans HM (1989) Anti-lipolytic action of insulin in adipocytes from starved and diabetic rats during adenosine-controlled incubations. *Endocrinology* **125**, 3044–3050.
- Palou A, Remesar X, Arola L, Herrera E & Alemany M (1981) Metabolic effects of short-term food deprivation in the rat. *Hormone Metab Res* **13**, 326–330.
- Porter MH, Fine JB, Cutchings AG, Bai Y & DiGirolamo M (2004) Sexual dimorphism in the response of adipose mass and cellularity to graded caloric restriction. *Obesity Res* **12**, 131–140.
- Rabinovitch A, Grill V, Renold AE & Cerasi E (1976) Insulin release and cyclic AMP accumulation in response to glucose in pancreatic islets of fed and starved rats. *J Clin Invest* **58**, 1209–1216.
- Remesar X, Fernández-López JA, Blay MT, Savall P, Salas A, Díaz-Silva M, Esteve M, Grasa MM & Alemany M (2002) Effect of oleoyl-oestrone on adipose tissue composition in male rats. *Int J Obes* **26**, 1092–1102.
- Sanchis D, Adán C, Ardévol A, Grasa MM, Cabot C, Balada F, Vilà R, Estruch J, Puerta M, Fernández-López JA, Remesar X & Alemany M (1997a) Short-term treatment with oleoyl-oestrone in liposomes (Merlin-2) strongly reduces the expression of the *ob* gene in young rats. *Biochem J* **326**, 357–360.
- Sanchis D, Balada F, Grasa MM, Virgili J, Peinado J, Monserrat C, Fernández-López JA, Remesar X & Alemany M (1996) Oleoyl-oestrone induces the loss of body fat in rats. *Int J Obes* **20**, 588–594.
- Sanchis D, Balada F, Picó C, Grasa MM, Virgili J, Farrerons C, Palou A, Fernández-López JA, Remesar X & Alemany M (1997b) Rats receiving the slimming agent Oleoyl-oestrone in liposomes (Merlin-2) decrease food intake but maintain thermogenesis. *Archiv Physiol Biochem* **105**, 663–672.
- Serafini MT & Alemany M (1987) A micro method for the enzymatic estimation of the degree of glycogen ramification. *J Biochem Biophys Meth* **15**, 33–39.
- Troyer D & Fernandes G (1996) Nutrition and apoptosis. *Nutr Res* **16**, 1959–1987.
- Zhang Y, Matheny M, Zolokutukhin S, Tumer N & Scarpace PJ (2002) Regulation of adiponectin and leptin expression in white and brown adipose tissues: influence of beta-3-adrenergic agonists, retinoic acid, leptin and fasting. *Biochem Biophys Acta* **1584**, 115–122.



## PAPER

# Short-term oral oleoyl-estrone treatment increases plasma cholesterol turnover in the rat

C Cabot<sup>1</sup>, A Salas<sup>1</sup>, R Ferrer-Lorente<sup>1</sup>, P Savall<sup>1</sup>, X Remesar<sup>1</sup>, JA Fernández-López<sup>1</sup>, M Esteve<sup>1</sup> and M Alemany<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>*Departament de Nutrició i Bromatologia, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain*

**OBJECTIVE:** Oral treatment with oleoyl-estrone induces the loss of body fat and improvement of insulin resistance. Since cholesterol levels are deeply affected by oleoyl-estrone, we investigated here whether short-term treatment affected cholesterol turnover and overall metabolite changes.

**DESIGN:** Wistar female rats received a single oral dose of 10  $\mu$ mol/kg oleoyl-estrone in 0.2 ml of sunflower oil. Groups of animals were killed at timed intervals and blood samples were taken. In a second experiment series, rats had implanted carotid and jugular cannulas and were given a single gavage of oleoyl-estrone. These rats were used for the measurement of the cholesterol turnover rate.

**MEASUREMENTS:** *Body weight change and food intake:* Glucose, total and HDL-cholesterol, triacylglycerols, 3-hydroxybutyrate, nonesterified fatty acids, insulin, HOMA score in the rats of the first series. *Cholesterol:* Cholesterol pool changes and cholesterol turnover rates in the rats of the second series.

**RESULTS:** OE induced early effects, decreasing food intake, cholesterol and HDL-cholesterol levels, and increasing insulin sensitivity (HOMA score). OE also increased cholesteryl-ester turnover, and decreased circulating total cholesterol, especially esterified cholesterol pools.

**CONCLUSIONS:** The role of early changes in insulin sensitivity induced by oral OE cannot explain *per se* the deep changes in cholesterol handling, essentially a consequence of accelerated lipoprotein turnover. However, the increase in cholesteryl-ester turnover observed with OE treatment may be, at least in part, a consequence of the decrease in insulin resistance. The compounded effect of increased insulin sensitivity and accelerated lipoprotein turnover may help explain the early and marked hypocholesterolaemic effects of OE.

*International Journal of Obesity* (2005) 29, 534–539. doi:10.1038/sj.ijo.0802898

Published online 18 January 2005

**Keywords:** oleoyl-estrone; cholesterol turnover; cholesteryl-esters; insulin resistance

## Introduction

Oleoyl-estrone is a powerful hormonal signal inducing the loss of body fat when given in pharmacological doses to rodents.<sup>1</sup> Oral gavages result in a dose-dependent loss of weight,<sup>2</sup> mostly due to the mobilisation of body lipids. This active utilisation of lipid reserves is carried out essentially by decreasing the lipid stores in white adipose tissue,<sup>1</sup> and the increased muscle utilisation of lipids<sup>3</sup> that result in a marked decrease of the respiratory quotient,<sup>1</sup> sparing body protein in a context in which food intake was decreased and energy expenditure maintained.<sup>4</sup> Chronic oleoyl-estrone treatment

also induces a decrease in insulin levels and insulin resistance, with maintenance of plasma glucose and liver glycogen.<sup>5,6</sup> The imbalance between maintained energy expenditure and decreased energy intake induced by oleoyl-estrone treatment is maintained at the expense of lipid stores;<sup>2</sup> the massive mobilisation of adipose tissue lipid, and its oxidation,<sup>1,7</sup> spares glucose and protein,<sup>4</sup> increasing the transport of lipids by the blood.

The effects of oleoyl-estrone on plasma lipids have been studied in rats typically after 10-day treatments. Nevertheless, the effects of oleoyl-estrone on food intake were already observable after 2 h of the oral administration of the hormone.<sup>8</sup> Oleoyl-estrone decreases circulating cholesterol, especially in the HDL fraction,<sup>3</sup> but does not alter the body cholesterol pool to a significant extent;<sup>7</sup> thus, any changes in plasma cholesterol dynamics may reflect modifications in lipoprotein turnover in addition to eventual changes in the rates of synthesis or excretion of cholesterol. Since the

\*Correspondence: Dr M Alemany, Department of Nutrition and Food Science, Faculty of Biology, University of Barcelona, Av. Diagonal, 645, Barcelona 08028, Spain.

E-mail: malemany@ub.edu

Received 24 May 2004; revised 18 September 2004; accepted 4 November 2004; published online 18 January 2005

mobilisation of cholesterol and its transport via the blood is one of the most marked effects of oleoyl-estrone on lipid metabolism, we studied the turnover rate of cholesterol in rat plasma shortly after a single dose of oral oleoyl-estrone, when massive lipid mobilisation had not yet been fully established.

### Experimental

Female Wistar rats (from Harlan-Interfauna, Sant Feliu de Codines, Spain) weighing 225–250 g were used. The animals were kept under standard environmental conditions; they were fed maintenance rat chow (Panlab, Barcelona, Spain), containing 13.3 kJ/g metabolisable energy (73% derived from carbohydrate, 19% from protein and 8% from lipid).

The experimental setup and procedures were accepted by the Ethics Committee of the University of Barcelona. All animal handling procedures were carried out following the guidelines established by the EU, and the Spanish and Catalan Governments.

The rats were subjected to a daily oral gavage of 10 µmol/kg and day of oleoyl-estrone (OED, Barcelona, Spain) in 0.2 ml of sunflower oil, by means of a stomach cannula. Controls received only the oil. Two sets of experiments were carried out. In the first, after receiving the first gavage, groups of rats were killed, at 0, 3, 6, 24 and 48 h, by decapitation; their blood was received into dry heparinised beakers. Plasma was extracted and stored at –80°C until processed. The blood was later used for the measurement of total cholesterol (Cholesterol reagent easy, Menarini, Firenze Italy), HDL-cholesterol using the same kit after using the HDL-cholesterol precipitant rat reagent (Randox, Antrim, UK), glucose (Trinder kit, Sigma, St Louis, MO, USA), nonesterified fatty acids (Wako Chemicals, Neuss, Germany), 3-hydroxybutyrate (kit 907979, Roche, Mannheim, Germany), total triacylglycerols (kit 11528, Biosystems, Barcelona, Spain) and insulin (SRI-13K kit, Linco, St Charles, MO, USA). The HOMA score<sup>9,10</sup> was calculated from the insulin and glucose data for each rat.

For the second experiment, in order to prepare cholesterol label-loaded plasma, two untreated intact 'donor' rats were killed and exsanguinated. The plasma was incubated for 18 h with 1.3 kBq/ml (ie 1 nmol) <sup>3</sup>H-labelled cholesterol (TRK330, Amersham Biosciences, Chalfont St Giles, UK) at room temperature<sup>11</sup> in order to equilibrate the label distribution within the different cholesterol pools of the plasma sample.

A group of rats were anaesthetized with i.p. sodium pentobarbital (50 mg/kg); two cannulae were then inserted in the right jugular vein using P10 Intramedic plastic tubing (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) and in the left carotid artery, using P50 tubing. The cannulas were filled with heparinised saline. In order to measure the cholesterol turnover, we followed the procedure outlined by Robins *et al.*<sup>12</sup> a group of cannulated rats received the oral oleoyl-estrone gavage in oil (or oil alone in the case of controls) and 6 h later, they received 0.20 ml of donor rat plasma (ie 830 kBq of cholesterol label, with a specific activity of

2.26 kBq/nmol for free cholesterol and 530 Bq/nmol for esterified cholesterol), infused through the jugular vein cannula, followed by a bolus of 0.1 ml of saline to clean the cannula. After 2 min, a 0.400 ml sample of blood was drawn from the carotid artery (initial value), and the extractions continued for up to 2 h, when the rats were killed.<sup>12</sup> The experiment was repeated using a second series of cannulated rats injected with 'donor' labelled plasma 3 days after receiving the OE gavage; blood extractions were again extended for up to 2 h.

The samples of blood containing labelled cholesterol were centrifuged to obtain plasma, which was extracted with trichloromethane/methanol (2:1 by volume).<sup>13</sup> The lipid extract was used for the estimation of total cholesterol radioactivity, and was subjected to TLC separation of cholesterol and cholesterol fatty esters using silicagel plates (Polygram, Wacherey-Nagel, Düren, Germany), eluted with hexane/ethyl ether/acetic acid (80:20:1 by volume) as mobile phase.<sup>14</sup> Cholesterol esters mean Rf was 0.95 and free cholesterol had an Rf value of 0.26. The areas of free and esterified cholesterol were identified in the plate, cut and counted using a standard liquid scintillation system.

Free and esterified cholesterol label data were adjusted to decay curves

$$L = P^{-Kdt} + 8$$

where  $L$  is the fraction of label remaining in the corresponding plasma pool,  $P$  is the initial mass of the cholesterol pool, 8 is a constant (long-term asymptotic value for free cholesterol, zero for cholesterol esters),  $dt$  is the time interval studied and  $K$  is the decay constant (ie half-life =  $1/K$ ).

The approximate sizes of circulating cholesterol pools were estimated from the plasma-unlabelled cholesterol concentrations and the mass of blood in the rat, roughly 5% of body weight,<sup>15</sup> assuming that plasma constitutes about 55% of the blood.

Two-way ANOVA and *post hoc* Bonferroni test were used to establish the differences between groups.

### Results

Table 1 presents the short-term changes induced by the OE gavage. The 2-day variation in body weight was small but already statistically significant; cumulative food intake was lower in OE-treated rats from the start: in the first 3 h, OE-treated rats ingested only half the food eaten by controls, irrespective of both having received an oil gavage of 7 kJ. In the whole 48 h period, OE-treated rats ingested 32% less food than controls.

Plasma glucose was unchanged by OE treatment, but increased with time. Insulin levels were practically unchanged in controls, but decreased by one-third with respect to controls from 6 h onwards. The HOMA score showed that the sensitivity to insulin tended to increase in controls but was maintained at a low setting in OE-treated animals.

**Table 1** Weight change, food intake and plasma parameters of Wistar rats at timed intervals after the onset of an oral treatment with oleoyl-estrone

Parameter	Units	Group	0 h	3 h	6 h	24 h	48 h	P (time)	P (OE)
Body weight	% of initial	Control	100	98.0±0.54	98.8±0.83	100.2±0.57	101.0±0.91	<b>0.029</b>	< <b>0.001</b>
		OE		99.7±0.65	97.7±0.41	98.1±0.33*	96.9±0.78*		
Cumulative food intake	g	Control	0	2.6±0.3	2.7±0.5	19.7±1.1	43.3±3.1	< <b>0.001</b>	< <b>0.001</b>
		OE		1.1±0.3	1.5±0.5	14.4±1.3	29.5±2.3		
Glucose	mM	Control	7.05±0.10	7.31±0.15	7.42±0.31	8.00±0.28*	7.82±0.19*	<b>0.013</b>	0.393
		OE		7.52±0.21	7.09±0.24	7.68±0.23	7.59±0.29		
Insulin	nM	Control	0.34±0.03	0.26±0.02	0.34±0.04	0.35±0.04	0.34±0.03	0.771	<b>0.041</b>
		OE		0.25±0.04	0.24±0.02	0.23±0.03	0.23±0.03		
HOMA index		Control	13.6±1.09	12.2±1.2	13.8±0.6	17.6±2.18	17.1±1.4	0.334	<b>0.002</b>
		OE		11.5±2.1	10.8±1.0	11.4±1.14*	11.1±1.6*		
Total cholesterol	mM	Control	1.48±0.13	1.83±0.19	1.75±0.08	1.56±0.10	1.50±0.13	< <b>0.001</b>	< <b>0.001</b>
		OE		1.72±0.04	1.18±0.02*	0.96±0.08*	0.90±0.04*		
HDL-cholesterol	mM	Control	1.05±0.10	1.20±0.13	1.16±0.16	0.99±0.16	1.00±0.16	<b>0.001</b>	< <b>0.001</b>
		OE		1.03±0.20	0.71±0.04	0.28±0.04*	0.23±0.02*		
HDL/total cholesterol ratio		Control	0.70±0.07	0.64±0.03	0.68±0.08	0.66±0.07	0.66±0.07	<b>0.003</b>	< <b>0.001</b>
		OE		0.61±0.09	0.62±0.01	0.27±0.05*	0.24±0.01		
Nonesterified fatty acids	mM	Control	0.69±0.06	0.69±0.04	0.59±0.07	0.58±0.08	0.52±0.08	0.497	0.301
		OE		0.66±0.06	0.66±0.04	0.64±0.08	0.64±0.04		
3-hydroxybutyrate	mM	Control	0.25±0.04	0.34±0.08	0.23±0.01	0.37±0.02	0.28±0.02	0.065	<b>0.031</b>
		OE		0.58±0.16	0.45±0.06	0.42±0.01	0.30±0.06		
Triacylglycerols	mM	Control	0.81±0.10	0.64±0.09	0.64±0.09	0.85±0.12	0.89±0.12	0.239	0.923
		OE		0.90±0.08	0.90±0.08	0.86±0.11	0.82±0.10		

Data are the mean±s.e.m. of data from six animals per group. Statistical comparison between groups was determined using a two-way ANOVA program. Statistically significant *P*-values are presented in bold type. \**P*<0.05 vs controls (Bonferroni *post hoc* test).

OE-treated rats decreased both total and HDL-cholesterol levels with time. In controls, the HDL/total cholesterol ratio was in the 64–70% range during the whole experiment, but in OE-treated rats decreased steadily, down to 61% at 3 h and to a minimum of 24% after 2 days (15% at 72 h). Thus, the decrease in circulating cholesterol affected more deeply HDL-cholesterol than free cholesterol.

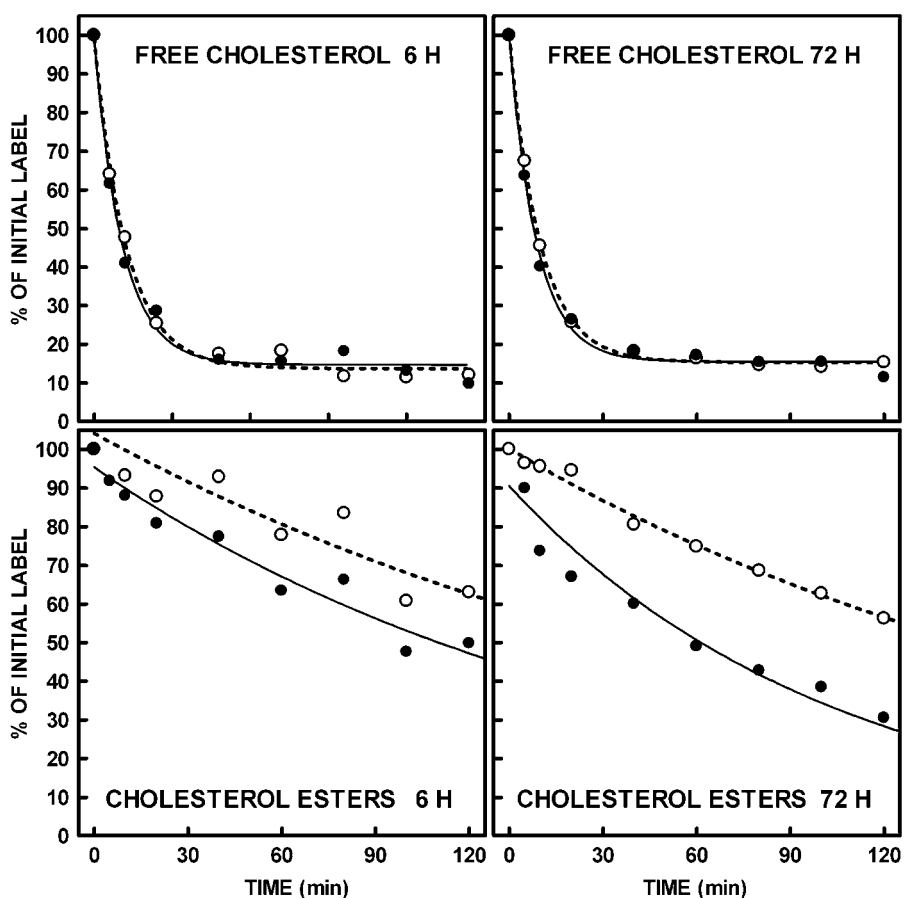
Other lipid metabolism parameters in plasma showed little short-term change with OE treatment. No differences were found due to treatment or time in nonesterified fatty acids and triacylglycerols. The levels of 3-hydroxybutyrate showed a barely significant early increase in OE-treated rats that was later normalised. The data on label decay corresponding to the second experiment are presented in Figure 1. Free cholesterol label decreased rapidly to very low levels of radioactivity in the first half hour after injection. However, the label in the esterified cholesterol fraction decreased much more slowly. The data obtained 6 h after the gavage were quite similar, both for free and esterified cholesterol, to those obtained after 3 days of treatment. OE accelerated the decay of esterified cholesterol label both at 6 and 72 h of the first OE gavage. Table 2 shows the calculated half-life values

for each series of data. The adjustment of data to the decay curves resulted in all cases in *r* values higher than 0.95. OE decreased the half-life values for esterified cholesterol with no changes in free cholesterol; controls also showed a significant effect of 'time' decreasing (to a lower extent, nevertheless, than under OE treatment) the half-life values of cholesterol esters with the duration of the gavages.

No changes were observed in the free cholesterol plasma pool. However, in OE-treated rats, the HDL-cholesterol pool decreased to 51% (in the 6 h period), and 19% (after 72 h) of the initial HDL cholesterol pool.

## Discussion

The present study shows that OE induces early metabolic changes in addition to its well-known mid- and long-term effects on body energy homeostasis. No relevant changes in fatty acid, triacylglycerol or ketone bodies levels were observed in the period studied; however, the deep modifications in cholesterol levels, pool size and turnover suggest a fast enhancement of lipoprotein-dependent interorgan cholesterol transport and metabolism.



**Figure 1** Free and esterified cholesterol label decay in control and OE-treated rats, 6 and 72 h after receiving the first gavage. Controls: white circles and dashed line; OE: black circles and continuous line. The data represent the mean  $\pm$  s.e.m. of five different rats.

**Table 2** Plasma cholesterol pool changes and cholesterol half-life in Wistar rats treated orally with oleoyl-estrone

Parameter	Units	Controls		OE treated		P-values	
		6 h	72 h	6 h	72 h	Time	OE
Total cholesterol levels	MM	1.23 $\pm$ 0.18	1.12 $\pm$ 0.10	0.83 $\pm$ 0.08	0.96 $\pm$ 0.09	0.969	<b>0.024</b>
HDL-cholesterol levels	mM	0.64 $\pm$ 0.10	0.67 $\pm$ 0.09	0.36 $\pm$ 0.05	0.14 $\pm$ 0.02	0.088	<b>&lt;0.001</b>
Total cholesterol plasma pool	$\mu$ mol	8.17 $\pm$ 1.12	8.92 $\pm$ 0.75	5.35 $\pm$ 0.53	6.83 $\pm$ 0.66	0.178	<b>0.009</b>
Free cholesterol plasma pool	$\mu$ mol	3.90 $\pm$ 0.53	3.58 $\pm$ 0.66	3.00 $\pm$ 0.74	5.82 $\pm$ 0.77	0.155	0.432
HDL-cholesterol plasma pool	$\mu$ mol	4.27 $\pm$ 0.69	5.34 $\pm$ 0.72	2.34 $\pm$ 0.32	1.02 $\pm$ 0.13	0.794	<b>&lt;0.001</b>
Plasma free cholesterol half-life	min	10.3 $\pm$ 1.8	10.2 $\pm$ 1.2	10.6 $\pm$ 1.6	8.7 $\pm$ 0.7	0.696	0.635
Plasma cholesterol-ester half-life	min	275 $\pm$ 53	211 $\pm$ 12	196 $\pm$ 37	110 $\pm$ 16	<b>0.016</b>	<b>0.002</b>

Data are the mean  $\pm$  SEM of data from six animals per group. Statistical comparison between groups was determined using a two-way ANOVA program. Statistically significant *P*-values are presented in bold type.

The insulin sensitivity increased significantly as indicated by the HOMA scores. This modulation of insulin sensitivity, which resulted in maintained glycaemia and decreased insulinaemia, was thus an early effect attributable to oral OE treatment. It is well known that OE decreases insulin

resistance,<sup>5,6</sup> but no short-term effects on this parameter were described previously.

The rapid turnover of plasma-free cholesterol showed no differences between controls and OE-treated rats; nevertheless, when these data were taken together with the

acceleration of the disposal of esterified cholesterol under OE treatment, the trend to increase the mobilisation of plasma cholesterol by OE became significant, and was dependent on the duration of treatment. The main effect of oleoylestrone on plasma cholesterol, thus, can be traced to the increased turnover and shrinking pool of esterified cholesterol, another indication of accelerated lipoprotein handling parallel to white adipose tissue wasting and active lipid oxidation.<sup>4,7</sup>

Insulin resistance alters the handling of lipoproteins, and thus that of HDL-cholesterol.<sup>16,17</sup> Hyperinsulinaemia also increases the synthesis and decreases the absorption of cholesterol.<sup>18</sup> However, the changes in cholesterol levels are often more directly associated to the consequences of insulin resistance and hyperinsulinaemia<sup>19</sup> than, to small extent, changes in insulin sensitivity such as those observed here. In addition, most effects of insulin resistance on cholesterol levels are mediated by the handling of lipoproteins, such as chylomicra remnants<sup>20,21</sup> or modulation of lipoprotein lipase.<sup>16,22</sup> The lack of changes in circulating triacylglycerol may point towards a limited extent of change in lipoprotein lipase, but OE is known to induce marked decreases in adipose tissue and increases in muscle lipoprotein lipase<sup>3</sup> that facilitate the transfer of lipid energy from adipose tissue to peripheral tissues. This means that the steady state of plasma triacylglycerol and nonesterified fatty acids is maintained, but lipoprotein handling is accelerated by OE treatment.<sup>3</sup> The data presented here agree with this interpretation.

The role of early changes in insulin sensitivity induced by oral OE cannot explain *per se* the deep changes in cholesterol handling, essentially a consequence of accelerated lipoprotein turnover. However, the progressively faster cholesteryl-ester turnover observed with time may be, at least in part, a consequence of the decrease in insulin resistance, since insulin controls this process.<sup>23</sup> This process may be in some way restrained by the marked decrease in hepatic lipase elicited by OE,<sup>3</sup> which may effectively limit the disposal of cholesterol by the liver. The compounded effect of increased insulin sensitivity and increased lipoprotein–lipid turnover may help explain the early and marked hypocholesterolaemic effects of OE.

#### Acknowledgements

Funding by grants 01/1300 and 01/1309 from the Fondo de Investigaciones Sanitarias from the Government of Spain is gratefully acknowledged.

#### References

- 1 Sanchis D, Balada F, Grasa MM, Virgili J, Peinado J, Monserrat C, Fernández-López JA, Remesar X, Alemany M. Oleoylestrone induces the loss of body fat in rats. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1996; **20**: 588–594.
- 2 Grasa MM, Cabot C, Esteve M, Yubero P, Masanés RM, Blay M, Vilà R, López-Martí J, Fernández-López JA, Remesar X, Alemany M. Daily oral oleoylestrone gavage induces a dose-dependent loss of fat in Wistar rats. *Obes Res* 2001; **9**: 202–209.
- 3 Blay M, Peinado-Onsurbe J, Grasa MM, Díaz-Silva M, Fernández-López JA, Remesar X, Alemany M. Effect of oral oleoylestrone treatment on plasma lipoproteins and tissue lipase and lipase activities of Zucker lean and obese female rats. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002; **26**: 618–626.
- 4 Sanchis D, Balada F, Picó C, Grasa MM, Virgili J, Farrerons C, Palou A, Fernández-López JA, Remesar X, Alemany M. Rats receiving the slimming agent oleoylestrone in liposomes (Merlin-2) decrease food intake but maintain thermogenesis. *Arch Physiol Biochem* 1997; **105**: 663–672.
- 5 Sanchis D, Adán C, Ardévol A, Grasa MM, Cabot C, Balada F, Vilà R, Estruch J, Puerta ML, Fernández-López JA, Remesar X, Alemany M. Short-term treatment with oleoylestrone in liposomes (Merlin-2) strongly reduces the expression of the ob gene in young rats. *Biochem J* 1997; **326**: 357–3608.
- 6 Adán C, Cabot C, Esteve M, Grasa MM, Masanés R, Vilà R, Estruch J, Fernández-López JA, Remesar X, Alemany M. Oleoylestrone treatment affects the ponderostat setting differently in lean and in obese Zucker rats. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1999; **22**: 366–373.
- 7 Remesar X, Fernández-López JA, Blay MT, Savall P, Salas A, Díaz-Silva M, Esteve M, Grasa MM, Alemany M. Effect of oral oleoylestrone on adipose tissue composition in male rats. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002; **26**: 1092–1102.
- 8 Remesar X, Guijarro P, Torregrosa C, Grasa MM, López J, Fernández-López JA, Alemany M. Oral oleoylestrone induces the rapid loss of body fat in Zucker lean rats fed a hyperlipidic diet. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000; **24**: 1405–1412.
- 9 Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Teacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and B cell function from fasting plasma glucose and insulin concentration in man. *Diabetologia* 1985; **28**: 412–419.
- 10 Bonora E, Saggiani F, Targher G, Zenere MB, Alberiche M, Monauni T, Bonadonna RC, Muggeo M. Homeostasis model assessment closely mirrors the glucose clamp technique in the assessment of insulin sensitivity. *Diabetes Care* 2000; **23**: 57–63.
- 11 Dell RB, Mott GE, Jackson EM, Ramakrishnan R, Carey KD, McGill HC, Goodman DWS. Whole body and tissue cholesterol turnover in the baboon. *J Lipid Res* 1985; **26**: 327–337.
- 12 Robins SJ, Fasulo JM, Collins MA, Patton GM. Cholesterol exchange and synthesis in the live rat. *J Lipid Res* 1985; **26**: 1230–1240.
- 13 Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 1957; **232**: 497–509.
- 14 Touchstone JC. Thin layer chromatographic procedures for lipid separation. *J Chromatogr B* 1995; **671**: 169–195.
- 15 Hobbs JT. Total blood volume: its measurement and significance. *Medical Monographs*. The Radiochemical Centre: Amersham; 1987.
- 16 Ferreira LDMC, Pulawa LK, Jensen DR, Eckel RH. Overexpressing human lipoprotein lipase in mouse skeletal muscle is associated with insulin resistance. *Diabetes* 2001; **50**: 1064–1068.
- 17 Ruotolo G, Howard BV. Dyslipemia of the metabolic syndrome. *Curr Cardiol Rep* 2002; **4**: 494–500.
- 18 Pihlajamäki J, Gylling H, Miettinen TA, Laakso M. Insulin resistance is associated with increased cholesterol synthesis and decreased cholesterol absorption in normoglycemic men. *J Lipid Res* 2004; **45**: 507–512.
- 19 Couillard C, Lamarche B, Tchernof A, Prud'homme D, Tremblay A, Bouchard C, Moorjani S, Nadeau A, Lupien PJ, Després JP. Plasma high-density lipoprotein cholesterol but not apolipoprotein A-I is a good correlate of the visceral obesity–insulin resistance dyslipidemic syndrome. *Metabolism* 1996; **45**: 882–888.

- 20 Ohnishi H, Saitoh S, Takagi S, Ohata J, Isobe T, Kikuchi Y, Takeuchi H, Shimamoto K. Relationship between insulin-resistance and remnant-like particle cholesterol. *Atherosclerosis* 2002; **164**: 167–170.
- 21 Chan DC, Watts GF, Barrett PHR, O'Neill FH, Redgrave TG, Thompson GR. Relationships between cholesterol homeostasis and triacylglycerol-rich lipoprotein remnant metabolism in the metabolic syndrome. *Clin Sci* 2003; **104**: 383–388.
- 22 Panarotto D, Remillard P, Bouffard L, Maheux P. Insulin resistance affects the regulation of lipoprotein lipase in the postprandial period and in an adipose tissue-specific manner. *Eur J Clin Invest* 2002; **32**: 84–92.
- 23 Riemens SC, van Tol A, Scheek LM, Dullaart RPF. Plasma cholesteryl ester transfer and hepatic lipase activity are related to high-density lipoprotein cholesterol in association with insulin resistance in type 2 diabetic and non-diabetic subjects. *Scand J Clin Lab Invest* 2001; **61**: 1–9.