



Universitat de les Illes Balears

Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut
Grup de Metabolisme Energètic i Nutrició

**EFFECTOS DEL GÉNERO, LA LOCALIZACIÓN ANATÓMICA DEL
TEJIDO Y LA SITUACIÓN HORMONAL SOBRE LA CAPACIDAD
LIPOLÍTICA DEL TEJIDO ADIPOSEO BLANCO**

Tesis Doctoral para optar al Grado de

Doctora por la *Universitat de les Illes Balears*

Programa de Doctorado de Nutrición Molecular
del *Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut*

Presentada por:

María Esperanza Pujol Holgado

Palma de Mallorca, Mayo de 2005

Con el beneplácito de las directoras

Dra. M^a del Pilar Roca Salom
Titular de Universidad de
Bioquímica y Biología Molecular

Dra. Isabel Lladó Sampol
Titular de Escuela Universitaria de
Bioquímica y Biología Molecular

La interesada

María Esperanza Pujol Holgado

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Quiero dar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que han contribuido, de una forma u otra, a la realización de esta tesis:

En primer lugar, quiero expresar mi gratitud a mis directoras de tesis, la Dra. Pilar Roca Salom y la Dra. Isabel Lladó Sampol, por la confianza que siempre han depositado en mí durante estos años, por su comprensión en los momentos de desánimo y por su dedicación para conseguir que esta tesis llegara a materializarse.

A todos los profesores del *Grup de Metabolisme Energètic i Nutrició*. A los doctores Magdalena Gianotti, Francisco J García-Palmer y Jordi Oliver, por su ayuda y consejos durante estos años. A la Dra. Ana M. Proenza, por su dedicación, en especial durante la fase final de mi tesis, y por los buenos momentos que hemos vivido juntas fuera de Mallorca.

Gracias al Dr. Antonio Vidal-Puig por darme la oportunidad de trabajar en su grupo y por el interés que mostró en mí. Y gracias a todas las personas de su laboratorio y, en especial, a Miguel e Irene, mis papás durante 3 meses, por hacer más agradable mi estancia en Cambridge.

Gracias a todos mis compañeros de laboratorio. Especialmente a Marta y Sergio, sin los que sin duda esta tesis no habría sido posible, maestros, amigos y apoyo constante; gracias por todo lo que hemos vivido dentro y fuera del labo. A Pedro, por ser tan buena persona y compañero de conciertos. A los que ya no habitan por el labo, Nuria, Joana y Quique, con quienes pasé momentos inolvidables (y muchas risas) que la distancia jamás podrá borrar. A Marga, mi hermanita pequeña, que se convirtió en hermana mayor, apoyándome en los momentos más duros, ... y adelantándose en la tesis. A Pili y Tomeu, que se han convertido en mis mejores amigos, compañeros de penas y, sobre todo, alegrías: Anastacia, Escocia, New York, y espero que un laaaargo etc, ... ¡no cambiéis nunca!!! A Ádamo y Elena, por tantos momentos compartidos, dentro y fuera del laboratorio, que nunca podré olvidar. A Toni, por ser una de las mejores personas que jamás he conocido y por hacernos reír tanto a todos. A Roberto y Toni S., compañeros de carreras en el sprint final, por tantos años juntos. A los recién llegados (que la fuerza os acompañe), así como al resto de personas que han ido pasando por aquí, mostrándome su apoyo y cariño en todo momento. ¡Gracias a todos, porque conocerlos ha sido sin duda lo mejor de esta tesis!!!!

A todo el personal de Administración y Servicios de la UIB, por facilitar nuestro trabajo y permitir que tanto nuestro laboratorio como nuestro edificio funcionen.

A mi familia. A mi padre, por sus esfuerzos para que pudiéramos vivir como reyes, a mi hermano, ayudándome o 'chinchándome', según la ocasión, como buen hermano mayor y, sobre todo, a mi madre, por desvivirse por nosotros, día tras día, dándonoslo todo; gracias a los tres por quererme y apoyarme siempre ¡os quiero! ... A mis suegros, mi cuñado, cuñadas y demás familiares que me han mostrado siempre tanto cariño y comprensión hacia mí. A Jesús, por quererme tanto y por estar siempre ahí, *en la salud y en la enfermedad, en la riqueza y en la pobreza*, ... ¡¡te adoro!!!

Esperanza Pujol
Palma de Mallorca, Mayo de 2005

ÍNDICE / CONTENTS

ABREVIATURAS / <i>ABBREVIATIONS</i>	II
RESUMEN / <i>ABSTRACT</i>	III
LISTADO DE PUBLICACIONES / <i>LIST OF PUBLICATIONS</i>	V
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. El tejido adiposo blanco	3
1. 2. Regulación de la acumulación y movilización de triacilgliceroles en el tejido adiposo	5
1. 2.1. La lipoproteína lipasa	5
1. 2. 2. La lipasa sensible a hormonas	6
1. 3. Capacidad lipolítica del tejido adiposo	6
1. 3. 1. Control adrenérgico de la lipólisis	6
1. 3. 2. Efecto de la localización anatómica sobre la capacidad lipolítica del tejido adiposo	9
1. 3. 3. Diferencias entre géneros en la capacidad lipolítica del tejido adiposo. Efecto de las hormonas sexuales	10
1. 4. Obesidad	11
1. 5. Gestación	12
1. 5.1. Glándula mamaria	13
2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL	17
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN / <i>RESULTS AND DISCUSSION</i>	23
- Gender effects on adrenergic receptor expression and lipolysis in white adipose tissue of rats	25
- Gender- and site-related effects on lipolytic capacity of rat white adipose tissue	37
- Pregnancy effects on rat adipose tissue lipolytic capacity are dependent on anatomical location	47
- Changes in mammary fat pad composition and lipolytic capacity throughout pregnancy	71
- α_2 - to β_3 -adrenoceptor switch in 3T3-L1 preadipocytes and adipocytes: modulation by testosterone, 17 β -estradiol and progesterone	93
4. RECAPITULACIÓN	101
5. CONCLUSIONES / <i>CONCLUSIONS</i>	107
6. BIBLIOGRAFÍA / <i>BIBLIOGRAPHY</i>	113
7. ANEXO / <i>APPENDIX</i>	125
- Sexual dimorphism in the adrenergic control of rat brown adipose tissue response to overfeeding	127
- Sex-dependent thermogenesis, differences in mitochondrial morphology and function, and adrenergic response in brown adipose tissue.	137
- Gender-related differences in morphology and thermogenic capacity of brown adipose tissue mitochondrial subpopulations.	145
- Rat brown adipose tissue thermogenic features are altered during mid-pregnancy	159

ABREVIATURAS / ABREVIATIONS

AC / AC	adenilato ciclasa / <i>adenilate cyclase</i>
AMPc / cAMP	Adenosín 3'-5'-monofosfato cíclico / <i>cyclic adenosin 3'-5'-monophosphate</i>
ApoCII / <i>apoCII</i>	apolipoproteína CII / <i>apolipoprotein CII</i>
β -ARK / β -ARK	proteín quinasa específica de receptores β -adrenérgicos / <i>β-adrenergic receptor kinase</i>
ARNm / mRNA	ácido ribonucleico mensajero / <i>messenger ribonucleic acid</i>
CREB / CREB	proteínas de unión a elementos de respuesta al AMPc / cAMP <i>response elements binding proteins</i>
ERK / ERK	quinasa regulada por una señal extracelular / <i>extracellular signal-regulated kinase</i>
Gi / Gi	proteínas G inhibitoras / <i>inhibitory G proteins</i>
cGi-PDE / cGi-PDE	fosfodiesterasa inhibida por GMPc / <i>cGMP-inhibited phosphodiesterase</i>
Gs / Gs	proteínas G estimuladoras / <i>stimulatory G proteins</i>
LPL / LPL	lipoproteína lipasa / <i>lipoprotein lipase</i>
LSH / HSL	lipasa sensible a hormonas / <i>hormone sensitive lipase</i>
MAPK / MAPK	proteín quinasa activada por mitógenos / <i>mitogen-activated protein kinase</i>
PKA / PKA	proteín quinasa A / <i>protein kinase A</i>
TAB / WAT	tejido adiposo blanco / <i>white adipose tissue</i>
VLDL / VLDL	lipoproteína de muy baja densidad / <i>very low density lipoprotein</i>



EFFECTOS DEL GÉNERO, LA LOCALIZACIÓN ANATÓMICA DEL TEJIDO Y LA SITUACIÓN HORMONAL SOBRE LA CAPACIDAD LIPOLÍTICA DEL TEJIDO ADIPOSO BLANCO

Tesis doctoral, M^a Esperanza Pujol Holgado, Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut, Universitat de les Illes Balears, Palma de Mallorca, España.

Resumen

El tejido adiposo blanco (TAB) está especializado en el almacenamiento y liberación de reservas grasas, jugando un papel clave en la regulación de la homeostasis energética en mamíferos. El tejido adiposo es un órgano heterogéneo, formado por diversos depósitos con marcadas diferencias metabólicas en función de su localización anatómica. Las catecolaminas juegan un papel central en la regulación de la lipólisis en el TAB, a través de la activación de los receptores adrenérgicos (AR), acoplados a proteínas G.

El eje central de esta tesis ha sido el estudio de los efectos que ejercen el género, la localización anatómica del depósito y la situación fisiológica u hormonal sobre la capacidad lipolítica del TAB. Para alcanzar este objetivo se han utilizado distintas aproximaciones experimentales: el estudio de las diferencias entre géneros y entre depósitos grasos en ratas control, entre ratas macho y hembra en respuesta a la dieta de cafetería y entre distintos depósitos grasos en la gestación, así como el estudio de los efectos directos de las hormonas sexuales en la línea celular 3T3-L1.

En ratas control, la capacidad lipolítica es superior en el depósito gonadal (visceral) que en el inguinal (subcutáneo), al ser menor la ratio α_2/β_3 -AR y mayores los niveles y la actividad de la LSH. Las ratas hembra control presentan una mayor inhibición de la lipólisis vía α_2 -AR que los machos, que se ve contrarrestada por una mayor respuesta lipolítica a agonistas β -adrenérgicos y una mayor capacidad lipolítica a nivel postreceptor. La dieta de cafetería induce un aumento en la ratio α_2/β_3 -AR, lo que podría ser responsable de la menor actividad lipolítica y el incremento de peso del tejido adiposo retroperitoneal. La gestación provoca en el TAB una disminución de los niveles de los distintos elementos de la cascada lipolítica, aunque con diferencias entre depósitos, que podrían determinar su papel durante la gestación. El depósito graso inguinal sufre una intensa transformación durante la gestación, debido al desarrollo de la glándula mamaria, con una disminución de los elementos de la cascada lipolítica y del balance LSH/LPL. En la línea de adipocitos 3T3-L1, el 17 β -estradiol y la progesterona podrían aumentar la lipólisis en adipocitos maduros, a través de los β_3 -AR, y la proliferación de los preadipocitos, a través de los α_2 -AR.

En su conjunto, los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta tesis permiten establecer la existencia de claras diferencias en las capacidades lipolíticas del tejido adiposo entre depósitos con distinta localización anatómica, así como entre géneros, tanto en una situación control, como en respuesta a la sobrealimentación, y en la gestación, pudiendo jugar el entorno hormonal un papel clave en estas diferencias.



EFFECTS OF GENDER, ANATOMICAL TISSUE LOCATION AND HORMONAL STATUS ON WHITE ADIPOSE TISSUE LIPOLYTIC CAPACITY

PhD thesis, M^a Esperanza Pujol Holgado, Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut, Universitat de les Illes Balears, Palma de Mallorca, Spain.

Abstract

White adipose tissue (WAT) is specialized in the storage and mobilization of fat stores, playing a key role in mammal energy homeostasis. Adipose tissue is a heterogeneous organ, made up of several depots with marked variations in fat cell metabolism depending on their anatomical location. Catecholamines play a major role in the regulation of WAT lipolysis, through the activation of adrenergic receptors (AR), coupled to G proteins.

The general aim of this thesis was to study the effects of gender, anatomical tissue location and the physiological or hormonal status on WAT lipolytic capacity. To this end, we carried out different approaches: the study of differences between genders and fat depots in control rats, between male and female rats in response to a cafeteria diet and between different fat depots throughout pregnancy, as well as the study of the direct effects of sex hormones on 3T3-L1 cells.

In control rats, the lipolytic capacity is higher in gonadal (visceral) than in inguinal WAT (subcutaneous), due to a lower α_2/β_3 -AR ratio and higher HSL levels and activity. Female control rats show a greater inhibition of lipolysis via α_2 -AR than males, which is counteracted by a higher lipolytic response to β -adrenergic agonists and a greater lipolytic capacity at the postreceptor level. Cafeteria diet feeding induces an increase in the α_2/β_3 -AR ratio, which could be responsible for the lower lipolytic capacity and the increase in retroperitoneal WAT weight. Pregnancy leads to a decrease in the levels of the different elements of the lipolytic pathway in WAT, although with some differences between the depots, which could determine their role during pregnancy. The inguinal fat pad undergoes a major transformation throughout pregnancy, due to the development of the mammary gland, with a decrease in the elements of the lipolytic pathway and in the HSL/LPL ratio. In the 3T3-L1 adipocyte cell line, 17β -estradiol and progesterone could increase lipolysis in mature adipocytes - through β_3 -AR - and preadipocyte proliferation - through α_2 -AR.

In conclusion, the results reported in this thesis establish the existence of clear differences in WAT lipolytic capacity between fat depots from different anatomical locations, as well as between genders, both in a control situation and in response to overfeeding, and in pregnancy; differences in which the hormonal milieu could play a key role.

LISTADO DE PUBLICACIONES / LIST OF PUBLICATIONS

Esta tesis se basa en los siguientes artículos / *This thesis is based on the following papers:*

- I. Lladó I, Rodríguez-Cuenca S, Pujol E, Monjo M, Estrany ME, Roca P, Palou A. Gender effects on adrenergic receptor expression and lipolysis in white adipose tissue of rats. *Obes Res* (2002) 10:296-305.
- II. Pujol E, Rodríguez-Cuenca S, Frontera M, Justo R, Lladó I, Kraemer FB, Gianotti M, Roca P. Gender- and site-related effects on lipolytic capacity of rat white adipose tissue. *Cell Mol Life Sci* (2003) 60: 1982-1989.
- III. Pujol E, Proenza AM, Lladó I, Roca P. Pregnancy effects on rat adipose tissue lipolytic capacity are dependent on anatomical location. Manuscript.
- IV. Pujol E, Proenza AM, Roca P, Lladó I. Changes in mammary fat pad composition and lipolytic capacity throughout pregnancy. Manuscript.
- V. Monjo M, Pujol E, Roca P. α_2 - to β_3 -adrenoceptor switch in 3T3-L1 preadipocytes and adipocytes: modulation by testosterone, 17β -estradiol and progesterone. *Am J Physiol Endocrinol Metab* (2005) 289: In press.

Además, durante la realización de la presente tesis, la doctoranda ha colaborado en la realización de otros estudios relacionados con el tema de la tesis, que han dado lugar a las publicaciones que se presentan en el anexo / *During this thesis, the PhD student has also been involved in complementary projects that have led to the publication of the manuscripts presented in the appendix:*

- VI. Rodríguez E, Monjo M, Rodríguez-Cuenca S, Pujol E, Amengual B, Roca P, Palou A. Sexual dimorphism in the adrenergic control of rat brown adipose tissue response to overfeeding. *Pflugers Arch* (2001) 442(3):396-403.
- VII. Rodríguez-Cuenca S, Pujol E, Justo R, Frontera M, Oliver J, Gianotti G, Roca P. Sex-dependent thermogenesis, differences in mitochondrial morphology and function, and adrenergic response in brown adipose tissue. *J Biol Chem* (2002) 277(45):42958-63.
- VIII. Justo R, Frontera M, Pujol E, Rodríguez-Cuenca S, Lladó I, García-Palmer FJ, Roca P, Gianotti M. Gender-related differences in morphology and thermogenic capacity of brown adipose tissue mitochondrial subpopulations. *Life Sci* (2005) 76(10):1147-58.
- IX. Frontera M, Pujol E, Rodríguez-Cuenca S, Català-Niell A, Roca P, García-Palmer FJ, Gianotti M. Rat brown adipose tissue thermogenic features are altered during mid-pregnancy. *Cell Physiol Biochem* (2005) 15: In press.

1. Introducción

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El tejido adiposo blanco

El tejido adiposo blanco (TAB) está especializado en el almacenamiento y liberación de reservas energéticas en forma de triacilgliceroles, lo que le otorga un papel central en la regulación de la homeostasis energética en mamíferos. De esta manera, la regulación del metabolismo del TAB está dirigida hacia un eficiente almacenamiento y liberación de los lípidos dependiendo de las necesidades del organismo (Coppack SW et al., 1994). Aunque hasta hace poco, el TAB se consideraba un simple reservorio pasivo de energía, hoy en día existen numerosas evidencias de que los adipocitos actúan como células endocrinas, ya que sintetizan y liberan numerosas hormonas, factores de crecimiento y citoquinas (Flier JS, 1995; Fruhbeck G et al., 2001; Serrero G et al., 1996). Entre las hormonas y factores liberados se encuentran la leptina, la resistina, la adiponectina, el factor de necrosis tumoral α , etc. y, además, el tejido adiposo es un lugar clave para el metabolismo de las hormonas sexuales y los glucocorticoides (Kershaw EE et al., 2004).

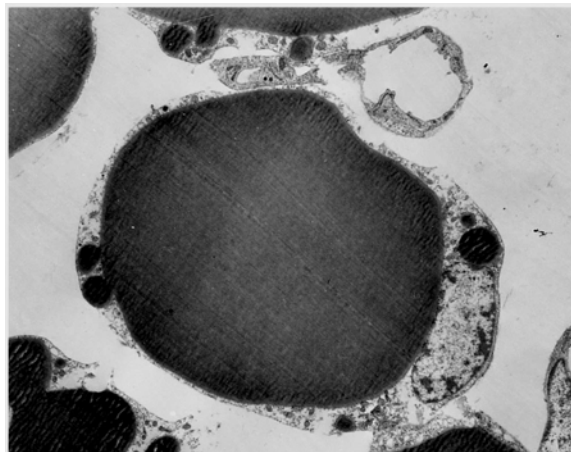


Figura 1. Morfología del adipocito blanco. Los adipocitos presentan una gran vacuola lipídica central, con el núcleo y el pequeño citoplasma desplazados hacia un lado de la célula.

El TAB está formado por células que presentan una gran vacuola lipídica, que ocupa casi la totalidad de la célula y que está constituida principalmente por triacilgliceroles. Por ello, el núcleo, así como la pequeña porción de citoplasma, se encuentran desplazados hacia un lado de la célula (véase Figura 1). Los adipocitos, para adaptarse a cambios en los niveles de reservas grasas acumuladas, son capaces de variar su tamaño, aumentando o disminuyendo hasta 20 veces su diámetro (Cinti S, 2001; Fruhbeck G et al., 2001). En el citoplasma, junto al núcleo, pueden observarse toda una serie de orgánulos celulares, entre los cuales encontramos mitocondrias

pequeñas, que poseen una morfología alargada, con crestas orientadas al azar (Cinti S, 2000; Cinti S, 2001). Es importante señalar que, aunque siempre se ha considerado que la maquinaria mitocondrial del TAB es escasa, algunos estudios han indicado la importancia de las mitocondrias en este tejido (Kopecky J et al., 1995), sugiriendo que el potencial oxidativo del TAB es cuantitativamente significativo a nivel del organismo entero (Prunet-Marcassus B et al., 1999).

El TAB se define como un órgano heterogéneo, que está formado por diversos depósitos, tanto subcutáneos como viscerales, localizados a lo largo del cuerpo. En ratas, los depósitos grasos viscerales más abundantes son el gonadal (ovárico o epididimal), que se encuentra rodeando las gónadas, y el mesentérico, que rodea los intestinos. El depósito subcutáneo más abundante en ratas es el que se encuentra en la región inguinal (Cinti S, 2000; Cinti S, 2001). El depósito retroperitoneal, que se encuentra detrás de los riñones, junto a la musculatura dorsal, ha sido definido como un depósito no visceral, no subcutáneo (Arner P, 1997) (véase Figura 2).

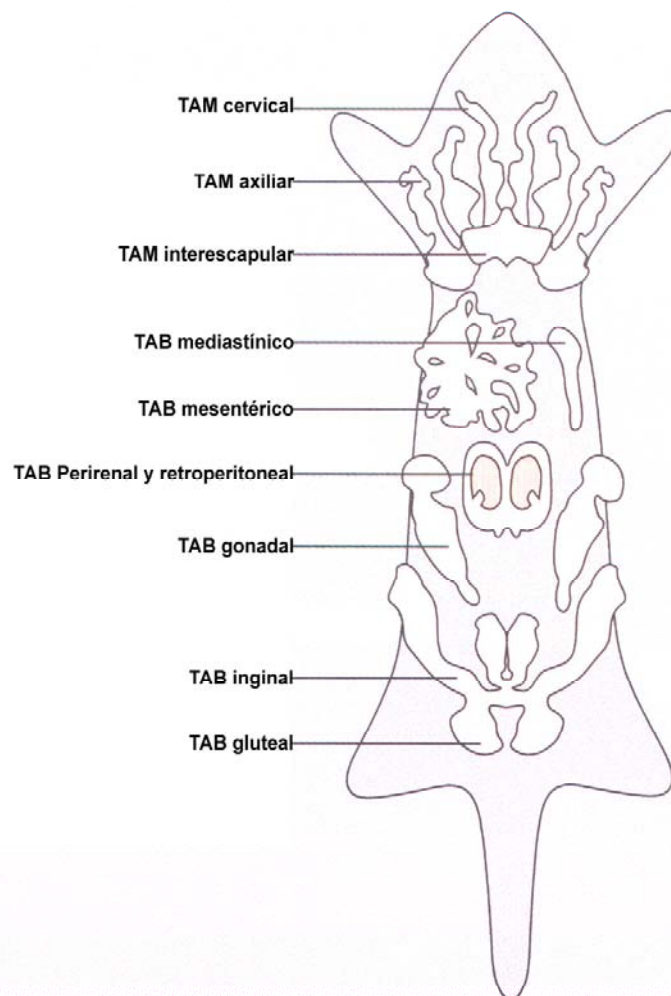


Figura 2. Localización de los depósitos grasos. (Modificada de Cinti S. 2000)

Los distintos depósitos difieren tanto en sus propiedades estructurales como bioquímicas (Pond CM et al., 1991), por lo que su tamaño y funcionalidad puede variar frente a distintas situaciones fisiopatológicas, pudiendo ser esta respuesta distinta en función de la localización anatómica (Arner P, 1995; Jensen MD, 1997).

1. 2. Regulación de la acumulación y movilización de triacilgliceroles en el tejido adiposo

1. 2.1. La lipoproteína lipasa

La enzima clave para la acumulación de triacilgliceroles en el tejido adiposo es la lipoproteína lipasa (LPL), que juega un papel crucial en el metabolismo y el transporte lipídico, catalizando el paso limitante de la hidrólisis de los triacilgliceroles presentes en los quilomicrones (procedentes de la dieta) y en las VLDL (sintetizados endógenamente) (Mead JR et al., 2002). Esta reacción proporciona ácidos grasos no esterificados y 2-monoacilglicerol. En el TAB los ácidos grasos son reesterificados, para almacenar energía en forma de triacilgliceroles. La unión inicial de los quilomicrones y las VLDL a la LPL está mediada por una interacción específica entre la enzima y la apoCII, proteína presente en ambos tipos de lipoproteína (Mead JR et al., 2002). La LPL se sintetiza en las células parenquimales de la mayoría de tejidos y es transportada después a su lugar de acción en el endotelio de los capilares. Esta enzima presenta una actividad elevada en TAB, corazón, músculo esquelético y en glándula mamaria durante la lactancia. En la glándula mamaria durante la lactancia, la LPL parece ser sintetizada por las células estromales, presumiblemente los adipocitos, y transportada al espacio intersticial, donde se encuentra presente en grandes concentraciones (Martin-Hidalgo A et al., 1994; Ramos P et al., 1999). La LPL está sujeta a una compleja regulación, específica de tejido, por factores hormonales y nutricionales que regulan la actividad LPL por mecanismos transcripcionales, postranscripcionales y postraduccionales. En el tejido adiposo, la insulina es el principal modulador de la actividad de la LPL (Mead JR et al., 2002; Preiss-Landl K et al., 2002), y la disminución de la actividad de esta enzima, que se produce al final de la gestación, se ha asociado a la resistencia a la acción de la insulina (Ramos P et al., 1996). En la glándula mamaria, cuando se acerca el momento del parto, la actividad de la LPL aumenta y se mantiene elevada durante la lactancia, contrariamente a lo que ocurre en los tejidos adiposos maternos (Ramos P et al., 1996; Ramos P et al., 1999). Esta incrementada actividad de la LPL en el tejido mamario durante la última parte de la gestación, además de aumentar el uso de los triacilgliceroles circulantes

para la producción de leche, es el principal factor causante de la disminución de la hipertrigliceridemia materna (Ramirez I et al., 1983).

1. 2. 2. La lipasa sensible a hormonas

La lipasa sensible a hormonas (LSH) constituye el paso limitante de la lipólisis (Holm C, 2003; Yeaman SJ et al., 1994) y su activación viene mediada por fosforilación por la proteína quinasa A (PKA). Sin embargo, es importante resaltar que actualmente existen toda una serie de evidencias que sugieren que, además de activar a la PKA, los receptores acoplados a proteínas G pueden activar la vía de la MAPK (mitogen-activated protein kinase) (Gutkind JS, 1998; van Biesen T et al., 1996). Así, en un estudio reciente se observó que una parte de la estimulación β -adrenérgica de la lipólisis vendría mediada por la vía de las MAPK y que la LSH sería también una diana citoplasmática de la ERK (extracelular signal-regulated kinase) (Greenberg AS et al., 2001). La LSH una vez activada, se transloca a la superficie de la vacuola lipídica, donde hidroliza los triacilgliceroles almacenados.

Además, la PKA también activa por fosforilación a las perilipinas. Las perilipinas son proteínas que se encuentran localizadas en la superficie de la vacuola lipídica de los adipocitos, donde cumplen una doble misión, suprimiendo la lipólisis basal y siendo un componente necesario para una estimulación lipolítica completa (Holm C, 2003; Tansey JT et al., 2001). Se ha propuesto que, en células no estimuladas, las perilipinas podrían impedir la interacción de la LSH con la vacuola lipídica, formando una barrera alrededor de la misma; cuando ambas proteínas son fosforiladas por la PKA, las perilipinas permitirían el acceso de la LSH activada a la vacuola lipídica, hidrolizando ésta los triacilgliceroles (Clifford GM et al., 2000; Londos C et al., 1996; Souza SC et al., 1998).

1. 3. Capacidad lipolítica del tejido adiposo

1. 3. 1. Control adrenérgico de la lipólisis

El sistema adrenérgico juega un papel central en la regulación de la lipólisis en el TAB, a través de la acción de las catecolaminas (adrenalina y noradrenalina), que actúan sobre los receptores adrenérgicos (AR) presentes en los adipocitos. Los receptores adrenérgicos pertenecen a dos grandes grupos, α y β . La importancia funcional de estos receptores difiere dependiendo de la especie, el género, la edad, y la localización anatómica del depósito graso (Lafontan M et al., 1995), así como de la situación fisiológica y patológica del individuo (Lafontan M et al., 1997).

En el adipocito se encuentran al menos cinco subtipos de receptores adrenérgicos diferentes: tres β -AR (β_1 , β_2 y β_3), un α_{2A} -AR y un α_{1B} -AR, todos ellos pertenecientes a la familia de receptores acoplados a proteínas G (Lafontan M et al., 1995).

La estimulación, por el sistema nervioso simpático, de los β -AR de las células adiposas cursa con la generación de AMPc mediante la activación de la adenilato ciclasa. Esta ruta está mediada por la proteína de unión a nucleótidos de guanina, proteína G estimuladora (Gs). Un incremento en los niveles intracelulares de AMPc provoca la activación de la PKA. Esta quinasa media, a través de fosforilación, la activación de la LSH (Carey GB, 1998). Además, existen otros sustratos de la PKA en las células adiposas como son la fosforilasa quinasa, la glucógeno sintasa, la acetil-coA carboxilasa, la fosfodiesterasa de AMPc de baja Km inhibida por GMPc (cGi-PDE), el transportador de glucosa GLUT4, las perilipinas (Londos C et al., 1996), los propios receptores adrenérgicos β_1 y β_2 (Hausdorff WP et al., 1990; Lefkowitz RJ et al., 1990) y varias proteínas nucleares implicadas en la regulación de la proliferación y diferenciación celular (Lalli E et al., 1994) (véase figura 3).

Los receptores adrenérgicos β_1 y β_2 son desensibilizados por fosforilación, en un proceso dependiente de la PKA, así como de otras quinastas específicas de receptores adrenérgicos (β -ARK), como mecanismo que podría limitar la acción del AMPc producido de forma sostenida, en una situación de continua estimulación adrenérgica. Sin embargo, el receptor adrenérgico β_3 (subtipo de β -adrenoreceptor predominante en las células adiposas de roedores (Granneman JG et al., 1992; Langin D et al., 1995)) carece de la secuencia consenso para la actuación de la PKA y las β -ARK, siendo así resistente a la desensibilización inducida por agonistas adrenérgicos, a diferencia de β_1 y β_2 . Esto posibilita el mantenimiento de la función del β_3 -AR durante más tiempo en situaciones de elevada estimulación adrenérgica (Lafontan M et al., 1997), convirtiéndolo en el mediador lipolítico más importante en respuesta a situaciones de elevada y sostenida activación del sistema nervioso simpático, como en el caso de una sobrealimentación o una exposición crónica al frío. Además, la activación de la cGi-PDE también es dependiente de fosforilación, por lo que, aparentemente, al menos en células adiposas, el AMPc, a través de un mecanismo de retroalimentación, podría controlar la actividad de su propia enzima degradativa (Degerman E et al., 1990; Manganiello VC et al., 1992).

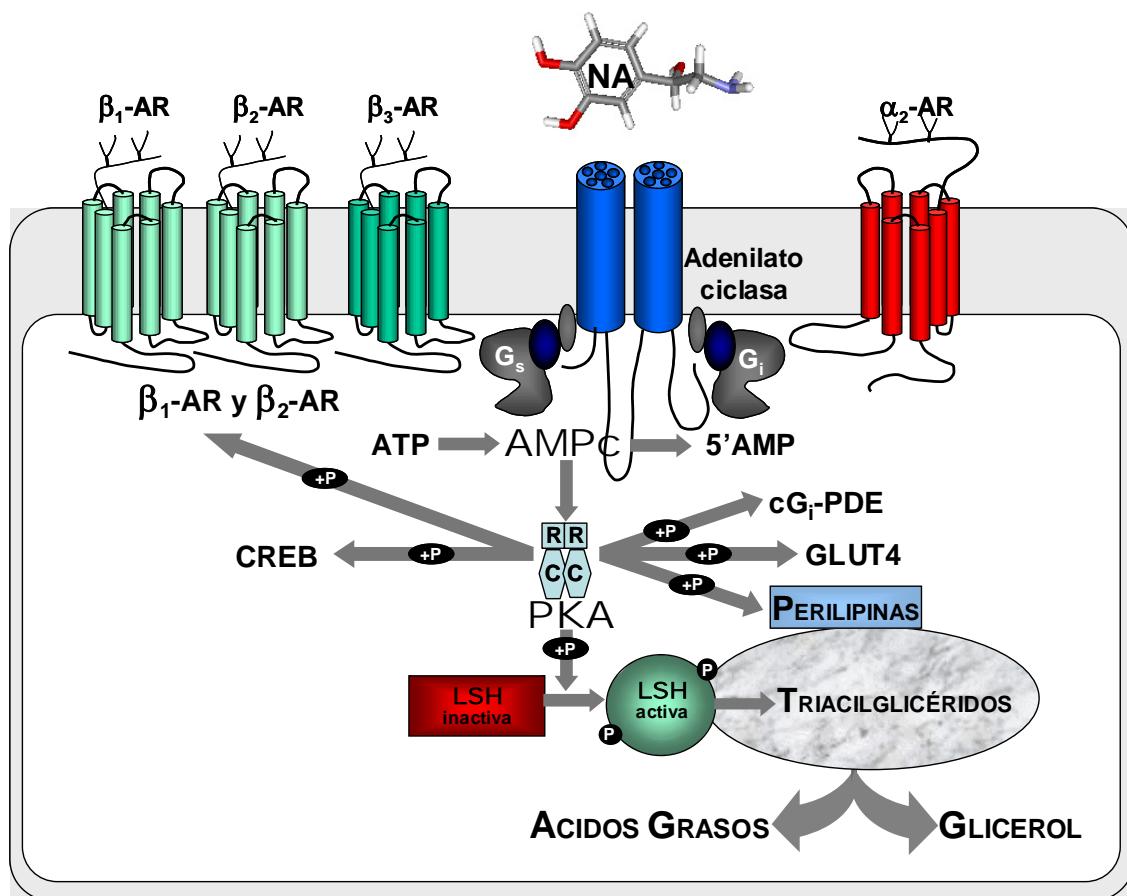


Figura 3. Esquema de la cascada de transducción de señales mediada por los receptores adrenérgicos en el adipocito blanco. A consecuencia de la unión de la noradrenalina a los receptores adrenérgicos, éstos estimulan la adenilato ciclasa vía proteínas G, compuestas por tres subunidades, que realizan un control positivo (G_s) o negativo (G_i) sobre la señal. La producción de AMPc cursa con una activación de la proteína quinasa A (PKA) que fosforila a su vez diferentes dianas como la lipasa sensible a hormonas (LSH), los receptores adrenérgicos β_1 y β_2 , las perilipinas, la fosfodiesterasa (cG_i -PDE), el transportador de glucosa GLUT4 y a proteínas de unión a elementos de respuesta a AMPc (CREB). Finalmente la LSH fosforilada hidroliza los triacilglicéridos presentes en el adipocito.

Por su parte, los α_2 -AR están acoplados a la adenilato ciclasa a través de las proteínas G inhibitoras (G_i). La estimulación de dichos receptores provoca la inhibición de la adenilato ciclasa, la reducción de los niveles de AMPc intracelular y, por lo tanto, la inhibición de la lipólisis, así como de otros eventos dependientes de AMPc como la regulación de la diferenciación de los preadipocitos (véase figura 3). Los α_2 -AR, de forma análoga a los β_1 - y β_2 -AR, también experimentan

desensibilización, vía fosforilación, y *down-regulation* tras la exposición prolongada a agonistas adrenérgicos (Saunders C et al., 1999).

En cuanto a la afinidad por la noradrenalina, los α_2 -AR presentan una afinidad superior a la de los β -AR. Así, en condiciones basales, con una baja concentración de noradrenalina, se activarían principalmente los α_2 -AR, con lo que la lipólisis se inhibiría. En cambio, en condiciones que provoquen una activación del sistema nervioso simpático, en las que las concentraciones de noradrenalina están incrementadas, se activarían los β -AR, de baja afinidad. En tales condiciones, la activación de los β -AR es capaz de contrarrestar y superar la inhibición provocada por la estimulación específica de los α_2 -AR, promoviéndose así la movilización lipídica (Arner P et al., 1990; Lafontan M et al., 1997).

Como los receptores β y α_2 coexisten en una misma célula, la distinta dotación y actividad de ambos tipos de receptores determinará si las catecolaminas presentes en un determinado momento activan la deposición o la movilización de grasas del TAB (Soloveva V et al., 1997), jugando, por tanto, el balance α_2/β -AR un papel clave en la regulación del metabolismo energético y del peso corporal (Valet P et al., 2000).

1. 3. 2. Efecto de la localización anatómica sobre la capacidad lipolítica del tejido adiposo

El TAB es un órgano que presenta marcadas diferencias en la actividad lipolítica en función de su localización anatómica (Arner P, 1995; Jensen MD, 1997). Así, tanto en ratas como en humanos, diversos estudios han demostrado una mayor respuesta lipolítica a la estimulación con catecolaminas en los depósitos adiposos viscerales comparado con los depósitos subcutáneos (Arner P, 1997; Dieudonne MN et al., 1992; Hellmer J et al., 1992; Lacasa D et al., 1991; Morimoto C et al., 1997; Portillo MP et al., 1999; Portillo MP et al., 2000; Rebuffe-Scrive M et al., 1989; Sztalryd C et al., 1994; van Harmelen V et al., 2002). Sin embargo, en humanos existen estudios con resultados contradictorios. Estas contradicciones podrían explicarse por la localización del depósito visceral o subcutáneo concreto que se estudia, o por el género, el índice de masa corporal o el estatus hormonal de los individuos participantes en el estudio. Así, por ejemplo, en hombres no obesos la lipólisis inducida por catecolaminas fue superior en el TAB visceral que en el subcutáneo, obteniéndose, sin embargo, resultados opuestos en mujeres premenopáusicas (Rebuffe-Scrive M et al., 1989). Las diferencias metabólicas entre los distintos depósitos grasos son de gran interés desde

el punto de vista fisiopatológico, ya que se ha sugerido que la aumentada actividad metabólica de los depósitos adiposos internos es responsable de la mayor prevalencia de hiperlipidemia, aterosclerosis, diabetes mellitus, resistencia a la insulina e hipertensión asociada a la obesidad central (Bjorntorp P, 1997; Kissebah AH, 1991).

Para explicar las diferencias en la lipólisis en función de la localización anatómica del tejido, se han propuesto variaciones en diversos puntos de la cascada de activación adrenérgica: desde una diferente dotación de receptores adrenérgicos (Mauriege P et al., 1987; Tavernier G et al., 1995), hasta diferencias en otros puntos de la cascada de activación adrenérgica a nivel postreceptor, incluyendo diferencias en la actividad adenilato ciclasa (Dieudonne MN et al., 1992) y en la actividad y los niveles de expresión de la LSH (Morimoto C et al., 1997; Sztalryd C et al., 1994; Tavernier G et al., 1995).

1. 3. 3. Diferencias entre géneros en la capacidad lipolítica del tejido adiposo. Efecto de las hormonas sexuales

Estudios previos han mostrado la existencia de diferencias en función del género en la capacidad lipolítica del TAB, en respuesta a la estimulación con catecolaminas. Así, por ejemplo, en el tejido adiposo gonadal de ratas, se observó una mayor lipólisis inducida por noradrenalina e isoprenalina en las hembras, en comparación con los machos (Llado I et al., 2000). Además, diversos estudios han observado diferencias entre géneros a distintos niveles de la cascada lipolítica, como por ejemplo en el número de receptores adrenérgicos (Llado I et al., 2000), en la lipólisis inducida por agentes que actúan a nivel de la adenilato ciclasa y la PKA (Lonnqvist F et al., 1997) y también en la actividad de la LSH (Kolehmainen M et al., 2002).

Se ha sugerido que estas diferencias entre géneros en la capacidad lipolítica podrían deberse al distinto entorno hormonal. En este sentido, diversos estudios sugieren un papel directo de las hormonas sexuales sobre el control del metabolismo de los tejidos adiposos, por ejemplo, afectando la lipólisis mediante la alteración de la sensibilidad y/o densidad de receptores α_2 y β , así como actuando sobre otros puntos de la cascada lipolítica, modulando la actividad y/o expresión de la adenilato ciclasa, la PKA o la LSH (Anderson LA et al., 2002; Giudicelli Y et al., 1993; Lacasa D et al., 1994; Malo A et al., 2001; Xu XF et al., 1991), y afectando a la incorporación de ácidos grasos a los tejidos mediante la LPL (Anderson LA et al., 2002). Así, la testosterona ha sido descrita como una hormona antiadipogénica, ya que inhibe la diferenciación de los preadipocitos y la actividad de la LPL, reduciendo por tanto la entrada de ácidos grasos en la célula (De Pergola G, 2000). Por el contrario, la progesterona ejerce

acciones proadipogénicas, ya que estimula el aumento del peso corporal y de la ingesta al suministrarse exógenamente a ratas, además de incrementar la actividad LPL en adipocitos maduros y la adiposidad en general, aunque siempre en presencia de estrógenos (Wade G, 1976). En cuanto a los estrógenos, se ha observado, por ejemplo, que el estradiol es capaz de aumentar la lipólisis en los depósitos viscerales de ratas ovariectomizadas, a través del aumento de la actividad de la adenilato ciclasa (Giudicelli Y et al., 1993).

Además, se ha demostrado la presencia de receptores de hormonas sexuales en los adipocitos (Mizutani T et al., 1994; O'Brien SN et al., 1998; Pedersen SB et al., 2001; Pedersen SB et al., 1996; Rodríguez-Cuenca S et al., 2005), lo que sugiere que las hormonas sexuales podrían ejercer sus efectos sobre la regulación del metabolismo lipídico, en gran medida, a través de sus receptores en las propias células adiposas (Mizutani T et al., 1994).

1. 4. Obesidad

En los países desarrollados, los factores dietéticos y nutricionales son importantes en la etiología de la obesidad y muchas veces se habla de obesidad dietética, aunque no debe olvidarse la idea de que son numerosos los factores, tanto ambientales como genéticos, que influyen en que un individuo desarrolle un estado obeso. Para el estudio de este tipo de obesidad, existen diferentes modelos animales, de entre los cuales cabe destacar el modelo de obesidad dietética inducido por la ingesta de lo que se conoce como dieta de cafetería (Wade G, 1976). Esta dieta posee un elevado contenido en calorías y lípidos, pero, además, es una dieta variada en sabores, olores y texturas, que incitan al animal de experimentación a su consumo, de manera que se consigue una ruptura en el control de la ingesta, induciendo al animal a una hiperfagia voluntaria (Rothwell NJ et al., 1979; Rothwell NJ et al., 1982; Sclafani A et al., 1976). El aumento en la ingesta calórica desemboca en la aparición de un estado obeso a pesar de la activación de la termogénesis inducida por la dieta (Castella J et al., 1986; Gianotti M et al., 1988; Lardy H et al., 1990; Llado I et al., 1991; Rothwell NJ et al., 1979). Así pues, este modelo presenta una gran semejanza con la obesidad que padece un elevado porcentaje de humanos en los países desarrollados (Vasselli JR et al., 1983), y de ahí su utilidad en el estudio de la obesidad.

Diversos estudios en ratas alimentadas con dieta de cafetería durante un período prologado han mostrado como dicha dieta provoca un aumento de peso y de los depósitos grasos, así como cambios en la composición tisular y la aparición de

resistencia a la insulina (Kretschmer BD et al., 2005; Llado I et al., 1991). Así, por ejemplo, el aumento de peso observado en el depósito adiposo lumbar fue principalmente debido a la deposición lipídica (86%) (Llado I et al., 1991), observándose además un incremento en el contenido de la mayoría de ácidos grasos (Llado I et al., 1996). Al someter a ratas a períodos más cortos de alimentación con dieta de cafetería, se observó también un incremento del peso corporal y de los depósitos grasos así como un incremento en los niveles de lípidos circulantes (Llado I et al., 2000; Rodríguez E et al., 2004). Además, dicha alimentación provocó un incremento en los niveles de ARNm del β_3 -AR y de la leptina en el depósito gonadal (Llado I et al., 2000), así como una mayor acumulación lipídica en depósitos viscerales, comparado con los subcutáneos, que podría venir mediado por una mayor expresión de factores de transcripción adipogénicos en los depósitos viscerales (Rodríguez E et al., 2004).

1. 5. Gestación

La gestación es un estado fisiológico que se caracteriza por cambios metabólicos muy importantes. El principal sustrato que atraviesa la placenta es la glucosa, seguida de los aminoácidos, lo que es responsable de la tendencia de la madre a desarrollar hipoglucemia e hipoaminoacidemia (Herrera E, 2000). El metabolismo lipídico se ve especialmente afectado durante la gestación, con importantes cambios en los depósitos grasos maternos, a pesar del hecho que la placenta es prácticamente impermeable a los lípidos, exceptuando los ácidos grasos libres y los cuerpos cetónicos (Herrera E, 2000). Durante los primeros dos tercios de gestación, cuando el crecimiento fetal es muy limitado, la acumulación de depósitos grasos en el organismo materno está incrementada, como consecuencia de una hiperfagia y una lipogénesis aumentadas, permitiendo así la acumulación de reservas energéticas. Durante el último tercio de la gestación, la madre cambia a un estado catabólico, para mantener el intenso crecimiento fetal, lo que lleva a un descenso en los depósitos grasos (Lopez-Luna P et al., 1991; Ramos MP et al., 2003). Estos dos estados metabólicos están asociados con adaptaciones en las funciones del adipocito, resultando en una predominancia de la vía lipogénica y lipolítica, respectivamente (Ramos MP et al., 2003). Algunos estudios han mostrado, en el tejido adiposo lumbar, variaciones a lo largo de la gestación en la respuesta a agonistas de la cascada lipolítica, así como en los niveles de β_3 -AR y en la actividad de la LSH y la LPL, que podrían relacionarse con los cambios de tamaño que experimenta dicho depósito durante la gestación (Martin-Hidalgo A et al., 1994; Ramos MP et al., 2003).

Las condiciones anabólicas presentes durante la primera parte de la gestación parecen estar provocadas por la insulina, que es la hormona anabólica más eficiente, y cuya concentración y secreción están aumentadas desde que se inicia la gestación (Ramos MP et al., 2003; Sorenson RL et al., 1997). Además, diversos estudios sugieren que, durante la gestación temprana, la madre tiene una respuesta a la insulina incrementada (Jovanovic L et al., 2001; Mills JL et al., 1998). En cambio, al final de la gestación, durante la fase catabólica, existe hiperinsulinemia, así como una resistencia a la acción de la insulina en la mayoría de tejidos (Ramos MP et al., 2003; Ryan EA et al., 1985). En oposición a dicha resistencia a la insulina, la glándula mamaria muestra una sensibilidad a la insulina aumentada durante la última parte de la gestación, debido a un aumento en la actividad quinasa del receptor de la insulina (Carrascosa JM et al., 1998).

Entre las múltiples adaptaciones metabólicas que se producen durante la gestación, cabe destacar los importantes cambios hormonales que sufre la madre, como el aumento en los niveles de progesterona y de estradiol (Frontera M et al., 2005; Gonzalez CG et al., 2002). Estas hormonas, como ya se ha comentado, ejercen efectos sobre el tejido adiposo, pudiendo, por tanto, jugar un papel clave en los cambios que dicho tejido sufre a lo largo de la gestación. Además, la progesterona y el estradiol han sido considerados como factores etiológicos en el desarrollo de la resistencia insulínica durante la gestación (Gonzalez C et al., 2000).

1. 5.1. Glándula mamaria

El depósito graso subcutáneo más grande y estudiado en ratas (DiGirolamo M et al., 1998; Lea-Currie YR et al., 1997; Portillo MP et al., 2000; Rodriguez E et al., 2004) se encuentra alrededor de la región inguinal. Este depósito está estrechamente relacionado con la glándula mamaria (Hausman GJ, 1982). La glándula mamaria es un órgano complejo formado por múltiples tipos celulares: células epiteliales, tejido adiposo y tejido conectivo, entremezclados con vasos sanguíneos, nervios, fibras de músculo liso, nódulos linfáticos y, junto a los pezones, epitelio queratinizado y glándulas sebáceas y sudoríparas. En la rata, las glándulas mamarias forman extensas láminas de tejido subcutáneo, que se extiende desde la región cervical hasta la inguinal, en forma de seis pares de glándulas ventrolaterales. Las glándulas torácicas, abdominales e inguinales varían en su grado de desarrollo, siendo las glándulas inguinales las más diferenciadas. El epitelio de glándula mamaria en la rata consiste en una serie de conductos que se entremezclan o que están completamente rodeados de tejido adiposo, dependiendo de su estado de desarrollo. Así, durante la

pubertad, la glándula mamaria crece a partir de una estructura rudimentaria, hasta formar una elaborada red de conductos en ratas vírgenes adultas. Con solo pequeñas variaciones durante el ciclo estral, la glándula se mantiene después quiescente hasta la gestación, cuando sufre extraordinarios cambios que la convierten en un órgano secretor completamente desarrollado, capaz de producir una copiosa secreción de leche. Este estado de diferenciación se mantiene hasta que cesa la secreción de leche. En ese momento, la glándula vuelve casi a su estado pregestación (Rudolph MC et al., 2003). Por tanto, en ratas no gestantes, este depósito está compuesto principalmente por adipocitos, con sólo escasos conductos epiteliales; sin embargo, hay un rápido y continuo desarrollo de células epiteliales durante los 21 días de gestación, con formación de conductos y alveolos (véase Figura 4) (Masso-Welch PA et al., 2000).

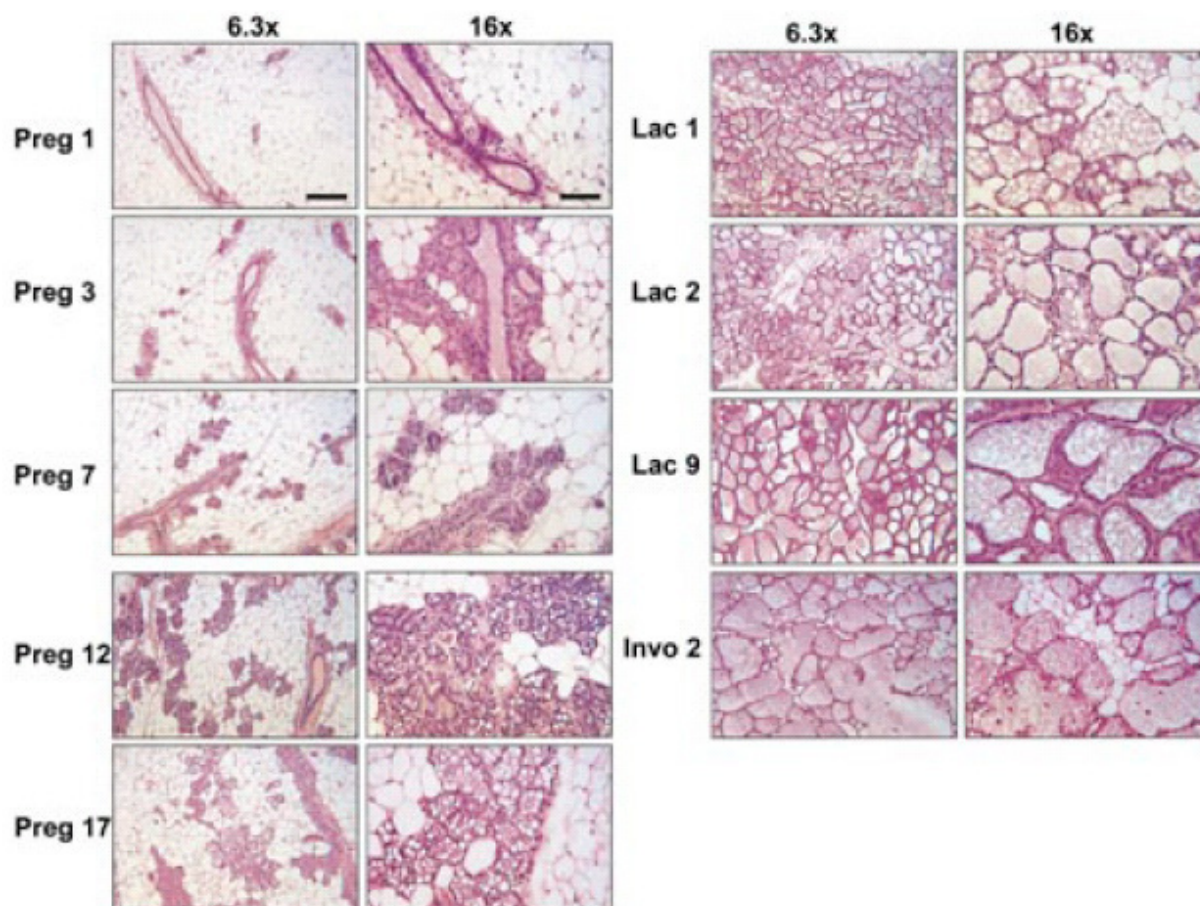


Figura 4. Histología de la glándula mamaria en distintas fases de la gestación, la lactancia y la involución. Secciones de tejido teñidas con eosina y hematoxilina, donde *Preg x* significa día *x* de gestación; *Lac x*, día *x* de lactancia; e *Invo x*, día *x* de involución. Fuente: Rudolph MC et al., 2003.

Durante el desarrollo gestacional de la glándula mamaria, los alveolos secretores se desarrollan a partir de células pluripotentes del propio sistema de conductos epiteliales (Rijnkels M et al., 2001; Smith GH et al., 1988). Sin embargo, se ha demostrado recientemente en ratón la existencia de una transdiferenciación directa y reversa de adipocitos a células epiteliales secretoras durante la gestación y la involución. Claramente, ambos procesos tienen lugar, variando su contribución relativa al desarrollo de la glándula mamaria durante la gestación y la lactancia en función de la especie, así como de las condiciones fisiopatológicas (Morrone M et al., 2004).

2. Objetivos y Planteamiento Experimental

2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL

El objetivo general de esta tesis fue estudiar los efectos sobre la capacidad lipolítica de diferentes depósitos de tejido adiposo blanco de rata de factores como el género, la localización anatómica o la situación fisiológica u hormonal.

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio habían puesto de manifiesto la existencia de diferencias dependientes del género en la regulación del peso corporal, tanto a nivel de una distinta respuesta termogénica en el tejido adiposo marrón (Quevedo S et al., 1998; Roca P et al., 1999; Rodriguez E et al., 2001), como en el grado de sobrepeso alcanzado y en la actividad lipolítica del tejido adiposo blanco (TAB), en respuesta a la alimentación con una dieta de cafetería (Llado I et al., 2000). Así, la alimentación con dieta de cafetería, durante un corto período de tiempo (15 días), provocó un mayor sobrepeso y una menor actividad lipolítica del TAB gonadal en las ratas hembra, en comparación con los machos. Asimismo, la lipólisis inducida por noradrenalina e isoprenalina fue mayor en las ratas hembra control que en los machos, aunque no se observaron diferencias entre géneros a nivel postreceptor (Llado I et al., 2000). Partiendo de estos antecedentes y del hecho que el tejido adiposo es un órgano heterogéneo, con diferencias marcadas en la actividad lipolítica en función de su localización anatómica (Arner P, 1995; Jensen MD, 1997), y que para explicar estas diferencias se han propuesto variaciones en diversos puntos de la cascada de activación adrenérgica, decidimos estudiar, en el TAB retroperitoneal de ratas macho y hembra, el efecto de la alimentación con dieta de cafetería durante 15 días sobre los niveles de receptores adrenérgicos y la capacidad lipolítica a lo largo de toda la cascada de activación adrenérgica. Los resultados obtenidos, así como su interpretación, aparecen en el **Manuscrito I**.

El distinto perfil lipolítico de los depósitos adiposos, las diferencias observadas entre machos y hembras y el hecho que las diferencias entre depósitos o géneros pudieran ser debidas a variaciones en los distintos puntos de la cascada de activación adrenérgica, nos decidió a realizar un estudio más completo, que englobara a la vez las diferencias debidas al género y a la localización anatómica del TAB (subcutáneo o visceral) a lo largo de toda la cascada de activación lipolítica. Así, estudiamos la capacidad lipolítica en distintos puntos de la cascada adrenérgica, así como los niveles de receptores adrenérgicos y del enzima limitante de la lipólisis, la lipasa sensible a hormonas (LSH), en ratas macho y hembra adultas, en un depósito de TAB visceral,

como es el gonadal, y uno subcutáneo, como es el inguinal. Los resultados obtenidos y sus conclusiones se detallan en el **Manuscrito II**.

Partiendo de las claras diferencias en la capacidad lipolítica observadas entre los distintos depósitos adiposos y entre géneros, no sólo a nivel de los receptores adrenérgicos, sino también a nivel postreceptor, lo cual confirmaba, por otra parte, la importancia de toda la vía, y teniendo en cuenta el posible papel que ejercen las hormonas sexuales sobre el control metabólico del tejido adiposo, actuando a distintos niveles de la cascada (Giudicelli Y et al., 1993; Lacasa D et al., 1994; Xu XF et al., 1991), nos planteamos estudiar la capacidad lipolítica de distintos depósitos grasos en una situación fisiológica con claros cambios hormonales, como es la gestación. Así, investigamos las diferencias que se producían a lo largo de la gestación en las características morfológicas de los adipocitos y en los niveles de los distintos elementos de la cascada lipolítica, así como en los niveles de lipoproteína lipasa, en diferentes depósitos de tejido adiposo de rata. Los resultados obtenidos y sus conclusiones se detallan en el **Manuscrito III**.

Dentro del estudio de las variaciones en la capacidad lipolítica de los tejidos adiposos a lo largo de la gestación, merece una mención aparte un depósito graso que sufre una importantísima transformación durante la gestación, el depósito graso subcutáneo de la zona inguinal. En ratas, el depósito graso subcutáneo más grande y más estudiado se encuentra alrededor de la región inguinal, y está estrechamente relacionado con el desarrollo de la glándula mamaria (Hausman GJ, 1982). En ratas no gestantes, este depósito está formado principalmente por adipocitos (Masso-Welch PA et al., 2000), por lo que ha sido ampliamente estudiado como depósito de tejido adiposo subcutáneo (DiGirolamo M et al., 1998; Lea-Currie YR et al., 1997; Portillo MP et al., 2000; Rodriguez E et al., 2004). Sin embargo, durante los aproximadamente 21 días que dura la gestación en la rata, se produce un rápido desarrollo de conductos y alvéolos de glándula mamaria en el seno de este depósito (Masso-Welch PA et al., 2000). Por ello, en el depósito subcutáneo inguinal, nos propusimos estudiar los cambios morfológicos y de composición que se producen a lo largo de la gestación en la rata, así como los niveles de los distintos elementos de la cascada lipolítica y de la lipoproteína lipasa. Los resultados y conclusiones obtenidos se muestran en el **Manuscrito IV**.

Nuestros estudios confirmaron la existencia de claras diferencias en la capacidad lipolítica entre machos y hembras y entre diferentes depósitos grasos con

distinta localización anatómica, tanto en situación control como en respuesta a una dieta hiperlipídica e hipercalórica, como es la dieta de cafetería, así como cambios en la capacidad lipolítica a lo largo de la gestación, situación fisiológica que se acompaña de importantes cambios hormonales. Además, diversos estudios previos habían sugerido un efecto directo de las hormonas sexuales en el control metabólico del tejido adiposo (Anderson LA et al., 2002; Giudicelli Y et al., 1993; Lacasa D et al., 1994; Malo A et al., 2001; Xu XF et al., 1991), por lo que las diferencias observadas en la capacidad lipolítica entre géneros y los cambios a lo largo de la gestación podrían ser debidas a variaciones en el entorno hormonal. Por ello, nuestro siguiente objetivo fue diseñar un estudio in vitro, utilizando la línea celular de adipocitos blancos 3T3-L1, para observar el efecto directo de la testosterona, el 17β -estradiol y la progesterona sobre la expresión de los distintos subtipos de receptores adrenérgicos, primer paso de la vía lipolítica, tanto en adipocitos blancos diferenciados, como durante el proceso de proliferación de los preadipocitos. Los resultados y conclusiones obtenidos se muestran en el **Manuscrito V**.

Los trabajos presentados en esta tesis se han llevado a cabo bajo la dirección de la Dra. M^a del Pilar Roca Salom y la Dra. Isabel Lladó Sampol en el *Grup de Metabolisme energètic i Nutrició* del *Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut* de la *Universitat de les Illes Balears*. Durante el desarrollo de esta tesis, la doctoranda ha disfrutado de una beca de postgrado del 'Programa Nacional de Formación de Profesorado Universitario' del Ministerio de Educación y Ciencia, incluyendo una ayuda para una estancia de tres meses en el Laboratorio de Bioquímica Clínica de la Universidad de Cambridge (Reino Unido), bajo la dirección del Dr. Antonio Vidal Puig. Igualmente, este trabajo ha sido posible gracias a los proyectos de investigación BFI2000-0988-C06-04 y PI021339, financiados por el Gobierno Español.

3. Resultados y Discusión / *Results and Discussion*

MANUSCRIPT I

Gender effects on adrenergic receptor expression and lipolysis in white adipose tissue of rats

Lladó I, Rodríguez-Cuenca S, Pujol E, Monjo M, Estrany ME, Roca P, Palou A.
Obes Res (2002) 10:296-305.

MANUSCRIPT II

Gender- and site-related effects on lipolytic capacity of rat white adipose tissue.

Pujol E, Rodríguez-Cuenca S, Frontera M, Justo R, Lladó I, Kraemer FB, Gianotti M, Roca P.
Cell Mol Life Sci (2003) 60: 1982-1989.

MANUSCRIPT III

Pregnancy effects on rat adipose tissue lipolytic capacity are dependent on anatomical location.

Pujol E, Proenza AM, Lladó I, Roca P.
Cell Physiol Biochem. 2005;16(4-6):229-36.

MANUSCRIPT IV

Changes in mammary fat pad composition and lipolytic capacity throughout pregnancy.

Pujol E, Proenza AM, Roca P, Lladó I.
Cell Tissue Res. 2006 Mar;323(3):505-511

MANUSCRIPT V

α_2 - to β_3 -adrenoceptor switch in 3T3-L1 preadipocytes and adipocytes: modulation by testosterone, 17β -estradiol and progesterone.

Monjo M, Pujol E, Roca P.

Am J Physiol Endocrinol Metab. 2005 Jul;289(1): E145-50.

4. Recapitulación

4. RECAPITULACIÓN

El eje central de esta tesis ha sido el estudio de los efectos que ejercen el género, la localización anatómica del depósito y la situación fisiológica u hormonal sobre la capacidad lipolítica del tejido adiposo blanco y su regulación. Para alcanzar este objetivo se han utilizado distintas aproximaciones experimentales: el estudio de las diferencias entre géneros y entre depósitos grasos en ratas control; el estudio de las diferencias entre ratas macho y hembra en respuesta a la alimentación con una dieta hipercalórica e hiperlipídica, como es la dieta de cafetería; el estudio de las diferencias entre distintos depósitos grasos en una situación con importantes cambios fisiológicos y hormonales como es la gestación; y, por último, el estudio *in vitro* de los efectos directos de las hormonas sexuales en la línea celular 3T3-L1 de adipocitos blancos.

El tejido adiposo es un órgano heterogéneo, con marcadas diferencias en la actividad lipolítica en función de diversos factores. Así, por ejemplo, varios estudios han observado, tanto en ratas como en humanos, una mayor respuesta lipolítica a la estimulación con catecolaminas en depósitos viscerales que en subcutáneos (Arner P, 1997; Lacasa D et al., 1991; Portillo MP et al., 1999; Sztalryd C et al., 1994; van Harmelen V et al., 2002). Además, estudios previos realizados en nuestro laboratorio habían establecido la existencia de diferencias en la respuesta a catecolaminas en el depósito gonadal en función del género, siendo esta respuesta mayor en las hembras (Llado I et al., 2000). El desarrollo de esta tesis nos ha permitido demostrar, a través del análisis detallado de toda la cascada de activación adrenérgica, que en ratas controles, e independientemente del género, la capacidad lipolítica es claramente superior en un depósito graso visceral, como es el gonadal, que en uno subcutáneo, como el inguinal. Estas diferencias se encuentran no sólo a nivel de los receptores adrenérgicos, con una mayor respuesta a agonistas adrenérgicos y una ratio α_2/β_3 -AR menor en el depósito gonadal, sino también a nivel postreceptor, con mayores niveles y actividad de la LSH en el depósito gonadal, comparado con el inguinal. Asimismo, en ratas control hemos podido establecer la existencia de claras diferencias en la regulación de la respuesta lipolítica entre géneros. Tanto en el tejido gonadal (visceral) como en el inguinal (subcutáneo) observamos como las ratas hembra, a diferencia de los machos, sufren una mayor inhibición de la lipólisis vía α_2 -AR, ya que presentan mayores niveles del α_2 -AR y una mayor ratio α_2/β_3 -AR, que los machos. No obstante, en las ratas hembra, esta inhibición se ve contrarrestada por una mayor respuesta

lipolítica a agonistas β -adrenérgicos y una mayor capacidad lipolítica a nivel postreceptor en ambos depósitos adiposos. Estas diferencias dependientes del género en la capacidad lipolítica podrían ser debidas, al menos en parte, a la acción de las hormonas sexuales, ya que diversos estudios han sugerido un papel directo de las mismas a distintos niveles a lo largo de la cascada lipolítica (Anderson LA et al., 2002; Giudicelli Y et al., 1993; Lacasa D et al., 1994; Malo A et al., 2001; Xu XF et al., 1991). Además, como resultado de este estudio, podemos afirmar que todos los elementos de la cascada lipolítica, y no sólo la cantidad de receptores adrenérgicos, deben tenerse en cuenta a la hora de determinar posibles diferencias en la capacidad lipolítica y en la regulación de la lipólisis entre distintos depósitos de TAB y entre géneros.

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio también habían puesto de manifiesto la existencia de diferencias entre géneros en la regulación del peso corporal en respuesta a la sobrealimentación con dieta de cafetería, con diferencias en el grado de sobrepeso alcanzado y en la actividad lipolítica del tejido adiposo gonadal, observándose que dicha dieta provocaba una reducción de la actividad lipolítica en ratas hembra, pero no en machos (Llado I et al., 2000). Los resultados obtenidos durante la realización de esta tesis indican que, en respuesta a la sobrealimentación durante 15 días con dieta de cafetería, las ratas hembra alcanzan un mayor grado de sobrepeso (17%) que los machos (6%), a pesar de ingerir la misma cantidad de calorías por gramo de peso corporal y día. Además, en ambos géneros, esta dieta hipercalórica provoca el aumento de peso del depósito retroperitoneal, como resultado de una hipertrofia tisular, ya que se observa un aumento del diámetro de los adipocitos. La alimentación con dieta de cafetería induce cambios en la ratio α_2/β -AR, como resultado del incremento de los niveles de α_2 -AR y de la reducción de los niveles de β_3 -AR, lo que podría ser responsable de la disminución de la actividad lipolítica, y contribuir al incremento de peso del depósito retroperitoneal. La mayor funcionalidad de los α_2 -AR, junto con el menor papel desarrollado por los β_3 -AR y las menores capacidades lipolíticas localizadas a nivel postreceptor en los machos sobrealimentados, en comparación con las hembras, podrían ser responsables de las diferencias entre géneros observadas en este estudio. Además, los resultados obtenidos en el TAB retroperitoneal difirieron de los obtenidos en los experimentos realizados previamente en el depósito gonadal, utilizando el mismo tratamiento dietético, lo que confirmaría no sólo la existencia de diferencias entre géneros, sino también entre tejidos con distinta localización anatómica.

La gestación es un estado fisiológico caracterizado por importantes adaptaciones metabólicas y grandes cambios hormonales en el organismo materno, todos ellos encaminados a permitir el desarrollo de los fetos y la preparación del período de lactancia. En la primera parte de la gestación predominan las reacciones anabólicas, que determinan la acumulación lipídica en los tejidos adiposos de la madre, mientras que durante el último tercio de la gestación las reservas grasas se movilizan para colaborar en el mantenimiento del rápido crecimiento fetal (Lopez-Luna P et al., 1991; Ramos MP et al., 2003). El estudio, a lo largo de la gestación, de las capacidades lipolíticas de diferentes depósitos de tejido adiposo ha mostrado una disminución generalizada en los niveles de los distintos elementos de la cascada adrenérgica, pero con diferencias sustanciales en función de la localización anatómica de los depósitos. El depósito gonadal y el mesentérico sí siguen el perfil típico, con una acumulación de reservas grasas durante la primera parte de la gestación, seguida de una movilización al final, aunque con diferencias importantes entre ambos depósitos en los principales puntos de regulación. Así, en el tejido adiposo mesentérico la reducción en los niveles de los elementos postreceptor es menor que en el gonadal y la ratio α_2/β_3 -AR juega un papel clave en la regulación del tamaño de este depósito, al seguir un perfil similar al del peso del tejido a lo largo de la gestación. Por el contrario, en el depósito adiposo gonadal la relación LPL/LSH tendría una mayor importancia como punto clave en la regulación. En cuanto al tejido adiposo retroperitoneal, su peso tisular presenta un incremento continuo a lo largo de toda la gestación, lo que podría ser indicativo de un posible papel de este depósito de grasa más adelante, tras el parto, aportando ácidos grasos para la fabricación de leche durante el período de lactancia.

El depósito de grasa subcutánea de mayor tamaño en la rata se halla en la región inguinal y, aunque está formado principalmente por adipocitos, está estrechamente relacionado con el desarrollo de la glándula mamaria (Hausman GJ, 1982). Así, presenta una intensa transformación estructural durante la gestación debido al desarrollo de la glándula mamaria en su seno, lo que determina, además, su distinto comportamiento metabólico durante este período, si se le compara con otros depósitos adiposos. El depósito de grasa mamario de la región inguinal sufre una importante disminución de los niveles de los distintos elementos de la cascada lipolítica, además de un incremento de los niveles de LPL y una disminución de la ratio LSH/LPL. Todos estos cambios permiten aumentar la acumulación de reservas grasas en este depósito, contribuyendo así al crecimiento del tejido, no sólo mediante el incremento

del tamaño de los adipocitos, sino también mediante la acumulación de gotículas de lípidos en las células epiteliales de la glándula mamaria, siendo dichos lípidos importantes en ambos casos para la lactogénesis.

Finalmente, los estudios realizados *in vitro*, en la línea celular de adipocitos 3T3-L1, confirman la importancia de las hormonas sexuales en la regulación de la proliferación de los preadipocitos, así como en la acumulación de lípidos en los adipocitos maduros, a través del efecto directo de estas hormonas sobre la expresión de los receptores adrenérgicos. El receptor adrenérgico más expresado en preadipocitos es el α_{2A} -AR, lo que indicaría su papel predominante en el proceso de proliferación de los preadipocitos. En cambio, el β_3 -AR es con diferencia el receptor adrenérgico más expresado en adipocitos maduros, indicando que dicho receptor tendría un papel más importante en el control de la lipólisis. El 17β -estradiol y la progesterona provocan un aumento de la proliferación de los preadipocitos, que podría estar relacionado con el aumento de la expresión de α_{2A} -AR que producen ambas hormonas. Esta estimulación de la proliferación de los preadipocitos por parte de la progesterona y el estradiol cobraría especial relevancia durante la gestación, período en el que dichas hormonas están elevadas, ya que podría contribuir, además de otros factores, a la acumulación de depósitos grasos durante este período, permitiendo el crecimiento de dichos tejidos, al menos en parte, por hiperplasia. Además, en adipocitos maduros, el 17β -estradiol y la progesterona aumentan la expresión génica tanto de α_{2A} -AR como de los receptores β -AR, mientras que la testosterona únicamente aumenta los niveles de ARNm de α_{2A} -AR. Por tanto, estos resultados sugieren que el 17β -estradiol y la progesterona, principalmente a través de los receptores β_3 -AR, podrían incrementar la lipólisis en los adipocitos maduros. En conjunto, las diferencias observadas en la expresión de los receptores adrenérgicos, en respuesta a la estimulación con testosterona, 17β -estradiol y progesterona, podrían ser importantes para explicar las diferencias entre géneros observadas en estudios *in vivo*, tanto en las capacidades lipolíticas, como en la distribución de los depósitos grasos.

En su conjunto, los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta tesis (manuscritos I-V) permiten establecer la existencia de claras diferencias en las capacidades lipolíticas del tejido adiposo entre depósitos con distinta localización anatómica, así como entre géneros, tanto en una situación control, como en respuesta a la sobrealimentación, y en la gestación, pudiendo jugar el entorno hormonal un papel clave en establecer dichas diferencias.

5. Conclusiones / *Conclusions*

5. CONCLUSIONES

1- En ratas control, la capacidad lipolítica del tejido adiposo gonadal, que es un depósito visceral, es claramente superior a la del inguinal, que es un depósito subcutáneo. Las diferencias entre ambos depósitos se producen en varios puntos de la cascada de activación adrenérgica, mostrando el tejido gonadal una menor ratio α_2/β_3 -AR, una mayor capacidad lipolítica en respuesta a agonistas adrenérgicos y unos mayores niveles y actividad de la lipasa sensible a hormonas.

2- Tanto en el tejido adiposo gonadal como en el inguinal, la lipólisis vía α_2 -AR se encuentra más inhibida en las ratas hembra que en los machos, al presentar éstas niveles superiores de α_2 -AR y una ratio α_2/β_3 -AR más elevada. No obstante, esta mayor inhibición en las hembras se ve contrarrestada por una incrementada respuesta lipolítica a agonistas β -adrenérgicos y, sobre todo, por una mayor capacidad lipolítica a nivel postreceptor, incluyendo una lipasa sensible a hormonas más activa.

3- En el tejido adiposo retroperitoneal, la alimentación con dieta de cafetería induce un incremento de los niveles de α_2 -AR y una disminución de los niveles de β_3 -AR, resultando en un aumento de la ratio α_2/β_3 -AR, que podría ser uno de los factores responsables de la disminución de la respuesta lipolítica y del incremento de peso del tejido en los animales alimentados con dieta de cafetería. En los machos, en comparación con las hembras, la funcionalidad de los α_2 -AR es mayor, mientras que el papel desempeñado por los β_3 -AR y las capacidades lipolíticas a nivel postreceptor son menores, lo que podría ser responsable de las diferencias entre géneros observadas en respuesta a la dieta de cafetería.

4- Durante la gestación se producen alteraciones en la vía lipolítica de los tejidos adiposos, con diferencias dependiendo de la localización anatómica del depósito. En el último tercio de la gestación, los tejidos adiposos gonadal y mesentérico cambian hacia un estado lipolítico, para mantener el rápido crecimiento fetal, pero con algunas diferencias entre ellos. Mientras que en el depósito mesentérico la reducción de los elementos postreceptor de la cascada lipolítica es menor y el balance α_2/β_3 -AR adquiere un papel predominante, en el depósito gonadal la ratio LPL/LSH alcanza una mayor importancia.

5- Durante la gestación, el depósito graso mamario de la zona inguinal sufre una notable transformación morfológica y metabólica, debido al desarrollo de la glándula mamaria en su seno. La disminución de los niveles de los distintos elementos de la cascada lipolítica, junto con el incremento de los niveles de LPL y la disminución de la ratio LSH/LPL serían responsables del continuo aumento en la acumulación de reservas grasas en este depósito durante la gestación, tanto en las células epiteliales, como en los adipocitos; reservas que podrán ser utilizadas durante la lactancia.

6- Durante el proceso de diferenciación de preadipocitos a adipocitos se produce un cambio manifiesto en el patrón de expresión de los receptores adrenérgicos, siendo el α_{2A} -AR el más expresado en preadipocitos y el β_3 -AR el más abundante en adipocitos maduros, lo que indicaría un papel predominante del α_{2A} -AR en el proceso de proliferación de los preadipocitos y del β_3 -AR en el control de la lipólisis en los adipocitos maduros.

7- El 17β -estradiol y la progesterona provocan un aumento en la proliferación de los preadipocitos de la línea 3T3-L1, que podría estar mediado por su efecto estimulador sobre la expresión del α_{2A} -AR. En adipocitos maduros, la testosterona aumenta los niveles de ARNm del α_{2A} -AR, mientras que el 17β -estradiol y la progesterona aumentan los niveles de ARNm tanto del α_{2A} -AR como de los β -AR. Por tanto, las hormonas sexuales femeninas podrían tener un papel más relevante en el control de la lipólisis a través de la modulación de los niveles del β_3 -AR.

5. CONCLUSIONS

1- In control rats, the lipolytic capacity is clearly higher in gonadal WAT, which is a visceral depot, than in inguinal WAT, which is a subcutaneous depot. The differences between both depots are due to differences in several steps of the lipolytic pathway, with a lower α_2/β_3 -AR ratio, a greater lipolytic capacity in response to adrenergic agonists, and higher hormone sensitive lipase levels and activity in gonadal WAT.

2- Both in gonadal and inguinal WAT, females show a greater inhibition of lipolysis via α_2 -AR, than males, due to higher α_2 -AR levels and a greater α_2/β_3 -AR ratio. However, this higher inhibition in females is counteracted by a greater lipolytic response to β -adrenergic agonists and, mainly, by a higher lipolytic capacity at the postreceptor level, including a more active hormone sensitive lipase.

3- In retroperitoneal WAT, cafeteria diet feeding induces an increase in α_2 -AR levels and a decrease in β_3 -AR levels, bringing about a higher α_2/β_3 -AR ratio, which could be one of the factors responsible for the impaired lipolytic capacity and the increase in retroperitoneal WAT weight, in animals fed with a cafeteria diet. In males, as compared to females, the functionality of α_2 -AR is higher, while the role played by β_3 -AR and the lipolytic capacities at the postreceptor level are lower, which could be responsible for the gender differences shown in response to cafeteria diet feeding.

4- During pregnancy, there are alterations in the adipose tissue lipolytic pathway, with differences depending on the anatomical location of the depot. In the last third of pregnancy, mesenteric and gonadal WAT change to a lipolytic state, in order to sustain rapid fetal growth, although with some differences between them: while in the mesenteric depot the reduction in the postreceptor elements of the lipolytic pathway is lower and the α_2/β_3 -AR ratio plays a key role, in gonadal WAT the LPL/HSL ratio has a greater importance.

5- During pregnancy, the mammary fat pad from the inguinal region undergoes a major metabolic and morphological transformation, due to the development of the mammary gland inside it. The reduction in the levels of the different elements of the lipolytic pathway, together with the increase in LPL levels and the decrease in the HSL/LPL ratio, would be responsible for the continuous increase in fat accumulation in this depot throughout pregnancy, both in the epithelial cells and the adipocytes; fat stores that could be used during lactation.

6- During the differentiation process from preadipocytes to adipocytes, there is a clear change in the adrenergic receptor expression profile - with α_{2A} -AR as the highest expressed in preadipocytes, and β_3 -AR in mature adipocytes - which would point to a predominant role of α_{2A} -AR in preadipocyte proliferation and β_3 -AR in the control of lipolysis in mature adipocytes.

7- 17β -estradiol and progesterone induce an increase in preadipocyte proliferation in the 3T3-L1 cell line, which could be related to their stimulatory effect on α_{2A} -AR expression. In mature adipocytes, testosterone increases α_{2A} -AR mRNA levels, while 17β -estradiol and progesterone increase both α_{2A} -AR and β -AR mRNA levels. Therefore, female sex hormones could play a key role in lipolysis control, through the modulation of β_3 -AR levels.

6. Bibliografía / *Bibliography*

6. BIBLIOGRAFÍA / BIBLIOGRAPHY

- Anderson LA, McTernan PG, Harte AL, Barnett AH and Kumar S. The regulation of HSL and LPL expression by DHT and flutamide in human subcutaneous adipose tissue. *Diabetes Obes. Metab.* (2002) **4**(3): 209-13.
- Arner P. Differences in lipolysis between human subcutaneous and omental adipose tissues. *Ann. Med.* (1995) **27**(4): 435-8.
- Arner P. Regional adiposity in man. *J. Endocrinol.* (1997) **155**(2): 191-2.
- Arner P, Kriegholm E, Engfeldt P and Bolinder J. Adrenergic regulation of lipolysis in situ at rest and during exercise. *J Clin Invest* (1990) **85**(3): 893-8.
- Bjorntorp P. Body fat distribution, insulin resistance, and metabolic diseases. *Nutrition* (1997) **13**(9): 795-803.
- Carey GB. Mechanisms regulating adipocyte lipolysis. *Adv. Exp. Med. Biol.* (1998) **441**: 157-70.
- Carrascosa JM, Ramos P, Molero JC and Herrera E. Changes in the kinase activity of the insulin receptor account for an increased insulin sensitivity of mammary gland in late pregnancy. *Endocrinology* (1998) **139**(2): 520-6.
- Castella J and Alemany M. Thermogenic effects of a "cafeteria" diet on the rat during its reproductive cycle. *Comp Biochem Physiol A* (1986) **85**(2): 203-6.
- Cinti S. Anatomy of the adipose organ. *Eat Weight Disord* (2000) **5**(3): 132-42.
- Cinti S. The adipose organ: morphological perspectives of adipose tissues. *Proc Nutr Soc* (2001) **60**(3): 319-28.
- Clifford GM, Londos C, Kraemer FB, Vernon RG and Yeaman SJ. Translocation of hormone-sensitive lipase and perilipin upon lipolytic stimulation of rat adipocytes. *J. Biol. Chem.* (2000) **275**(7): 5011-5.
- Coppack SW, Jensen MD and Miles JM. In vivo regulation of lipolysis in humans. *J Lipid Res* (1994) **35**(2): 177-93.
- De Pergola G. The adipose tissue metabolism: role of testosterone and dehydroepiandrosterone. *Int J Obes Relat Metab Disord* (2000) **24 Suppl 2**: S59-63.
- Degerman E, Smith CJ, Tornqvist H, Vasta V, Belfrage P and Manganiello VC. Evidence that insulin and isoprenaline activate the cGMP-inhibited low-Km

- cAMP phosphodiesterase in rat fat cells by phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1990) **87**(2): 533-7.
- Dieudonne MN, Pecquery R and Giudicelli Y. Characteristics of the alpha 2/beta-adrenoceptor-coupled adenylate cyclase system and their relationship with adrenergic responsiveness in hamster fat cells from different anatomical sites. *Eur. J. Biochem.* (1992) **205**(2): 867-73.
- DiGirolamo M, Fine JB, Tagra K and Rossmanith R. Qualitative regional differences in adipose tissue growth and cellularity in male Wistar rats fed ad libitum. *Am J Physiol* (1998) **274**(5 Pt 2): R1460-7.
- Flier JS. The adipocyte: storage depot or node on the energy information superhighway? *Cell* (1995) **80**(1): 15-8.
- Frontera M, Pujol E, Rodriguez-Cuenca S, Catala-Niell A, Roca P, Garcia-Palmer FJ, et al. Rat brown adipose tissue thermogenic features are altered during mid-pregnancy. *Cellular Physiology and Biochemistry* (2005) **15**: In press.
- Fruhbeck G, Gomez-Ambrosi J, Muruzabal FJ and Burrell MA. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* (2001) **280**(6): E827-47.
- Gianotti M, Roca P and Palou A. Body weight and tissue composition in rats made obese by a cafeteria diet. Effect of 24 hours starvation. *Horm Metab Res* (1988) **20**(4): 208-12.
- Giudicelli Y, Dieudonne MN, Lacasa D, Pasquier YN and Pecquery R. Modulation by sex hormones of the membranous transducing system regulating fatty acid mobilization in adipose tissue. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* (1993) **48**(1): 91-100.
- Gonzalez C, Alonso A, Alvarez N, Diaz F, Martinez M, Fernandez S, et al. Role of 17beta-estradiol and/or progesterone on insulin sensitivity in the rat: implications during pregnancy. *J Endocrinol* (2000) **166**(2): 283-91.
- Gonzalez CG, Alonso A, Balbin M, Diaz F, Fernandez S and Patterson AM. Effects of pregnancy on insulin receptor in liver, skeletal muscle and adipose tissue of rats. *Gynecol Endocrinol* (2002) **16**(3): 193-205.
- Granneman JG and Lahners KN. Differential adrenergic regulation of beta 1- and beta 3-adrenoreceptor messenger ribonucleic acids in adipose tissues. *Endocrinology* (1992) **130**(1): 109-14.

- Greenberg AS, Shen WJ, Muliro K, Patel S, Souza SC, Roth RA, et al. Stimulation of lipolysis and hormone-sensitive lipase via the extracellular signal-regulated kinase pathway. *J. Biol. Chem.* (2001) **276**(48): 45456-61.
- Gutkind JS. The pathways connecting G protein-coupled receptors to the nucleus through divergent mitogen-activated protein kinase cascades. *J Biol Chem* (1998) **273**(4): 1839-42.
- Hausdorff WP, Caron MG and Lefkowitz RJ. Turning off the signal: desensitization of beta-adrenergic receptor function. *Faseb J* (1990) **4**(11): 2881-9.
- Hausman GJ. Adipocyte development in subcutaneous tissues of the young rat. *Acta Anat (Basel)* (1982) **112**(3): 185-96.
- Hellmer J, Marcus C, Sonnenfeld T and Arner P. Mechanisms for differences in lipolysis between human subcutaneous and omental fat cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* (1992) **75**(1): 15-20.
- Herrera E. Metabolic adaptations in pregnancy and their implications for the availability of substrates to the fetus. *Eur J Clin Nutr* (2000) **54 Suppl 1**: S47-51.
- Holm C. Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Biochem Soc Trans* (2003) **31**(Pt 6): 1120-4.
- Jensen MD. Lipolysis: contribution from regional fat. *Annu. Rev. Nutr.* (1997) **17**: 127-39.
- Jovanovic L, Knopp RH, Brown Z, Conley MR, Park E, Mills JL, et al. Declining insulin requirement in the late first trimester of diabetic pregnancy. *Diabetes Care* (2001) **24**(7): 1130-6.
- Kershaw EE and Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* (2004) **89**(6): 2548-56.
- Kissebah AH. Insulin resistance in visceral obesity. *Int. J. Obes.* (1991) **15 Suppl 2**: 109-15.
- Kolehmainen M, Vidal H, Ohisalo JJ, Pirinen E, Alhava E and Uusitupa MI. Hormone sensitive lipase expression and adipose tissue metabolism show gender difference in obese subjects after weight loss. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* (2002) **26**(1): 6-16.
- Kopecky J, Clarke G, Enerback S, Spiegelman B and Kozak LP. Expression of the mitochondrial uncoupling protein gene from the aP2 gene promoter prevents genetic obesity. *J Clin Invest* (1995) **96**(6): 2914-23.

- Kretschmer BD, Schelling P, Beier N, Liebscher C, Treutel S, Kruger N, et al. Modulatory role of food, feeding regime and physical exercise on body weight and insulin resistance. *Life Sci* (2005) **76**(14): 1553-73.
- Lacasa D, Agli B, Pecquery R and Giudicelli Y. Influence of ovariectomy and regional fat distribution on the membranous transducing system controlling lipolysis in rat fat cells. *Endocrinology* (1991) **128**(2): 747-53.
- Lacasa D, Denis D, Agli B, De Mazancourt P and Giudicelli Y. Rat preadipocyte adenylyl cyclase: influence of fat localization and androgenic status. *Biochim. Biophys. Acta* (1994) **1224**(3): 527-32.
- Lafontan M, Barbe P, Galitzky J, Tavernier G, Langin D, Carpenne C, et al. Adrenergic regulation of adipocyte metabolism. *Hum Reprod* (1997) **12 Suppl 1**: 6-20.
- Lafontan M and Berlan M. Fat cell alpha 2-adrenoceptors: the regulation of fat cell function and lipolysis. *Endocr Rev* (1995) **16**(6): 716-38.
- Lalli E and Sassone-Corsi P. Signal transduction and gene regulation: the nuclear response to cAMP. *J Biol Chem* (1994) **269**(26): 17359-62.
- Langin D, Tavernier G and Lafontan M. Regulation of beta 3-adrenoceptor expression in white fat cells. *Fundam. Clin. Pharmacol.* (1995) **9**(2): 97-106.
- Lardy H and Shrago E. Biochemical aspects of obesity. *Annu Rev Biochem* (1990) **59**: 689-710.
- Lea-Currie YR, Wen P and McIntosh MK. Dehydroepiandrosterone-sulfate (DHEAS) reduces adipocyte hyperplasia associated with feeding rats a high-fat diet. *Int J Obes Relat Metab Disord* (1997) **21**(11): 1058-64.
- Lefkowitz RJ, Hausdorff WP and Caron MG. Role of phosphorylation in desensitization of the beta-adrenoceptor. *Trends Pharmacol Sci* (1990) **11**(5): 190-4.
- Llado I, Estrany ME, Rodriguez E, Amengual B, Roca P and Palou A. Effects of cafeteria diet feeding on beta3-adrenoceptor expression and lipolytic activity in white adipose tissue of male and female rats. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* (2000) **24**(11): 1396-404.
- Llado I, Pons A and Palou A. Changes in fatty acid composition in rat adipose tissue induced by dietary obesity. *Biochem Mol Biol Int* (1996) **40**(2): 295-303.
- Llado I, Proenza AM, Serra F, Palou A and Pons A. Dietary-induced permanent changes in brown and white adipose tissue composition in rats. *Int J Obes* (1991) **15**(6): 415-9.

- Londos C, Gruia-Gray J, Brasaemle DL, Rondinone CM, Takeda T, Dwyer NK, et al. Perilipin: possible roles in structure and metabolism of intracellular neutral lipids in adipocytes and steroidogenic cells. *Int J Obes Relat Metab Disord* (1996) **20 Suppl 3**: S97-101.
- Lonnqvist F, Thorne A, Large V and Arner P. Sex differences in visceral fat lipolysis and metabolic complications of obesity. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (1997) **17**(7): 1472-80.
- Lopez-Luna P, Maier I and Herrera E. Carcass and tissue fat content in the pregnant rat. *Biol Neonate* (1991) **60**(1): 29-38.
- Malo A and Puerta M. Oestradiol and progesterone change beta3-adrenergic receptor affinity and density in brown adipocytes. *Eur. J. Endocrinol.* (2001) **145**(1): 87-91.
- Manganiello VC, Degerman E, Smith CJ, Vasta V, Tornqvist H and Belfrage P. Mechanisms for activation of the rat adipocyte particulate cyclic-GMP-inhibited cyclic AMP phosphodiesterase and its importance in the antilipolytic action of insulin. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* (1992) **25**: 147-64.
- Martin-Hidalgo A, Holm C, Belfrage P, Schotz MC and Herrera E. Lipoprotein lipase and hormone-sensitive lipase activity and mRNA in rat adipose tissue during pregnancy. *Am J Physiol* (1994) **266**(6 Pt 1): E930-5.
- Masso-Welch PA, Darcy KM, Stangle-Castor NC and Ip MM. A developmental atlas of rat mammary gland histology. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* (2000) **5**(2): 165-85.
- Mauriege P, Galitzky J, Berlan M and Lafontan M. Heterogeneous distribution of beta and alpha-2 adrenoceptor binding sites in human fat cells from various fat deposits: functional consequences. *Eur. J. Clin. Invest.* (1987) **17**(2): 156-65.
- Mead JR, Irvine SA and Ramji DP. Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease. *J Mol Med* (2002) **80**(12): 753-69.
- Mills JL, Jovanovic L, Knopp R, Aarons J, Conley M, Park E, et al. Physiological reduction in fasting plasma glucose concentration in the first trimester of normal pregnancy: the diabetes in early pregnancy study. *Metabolism* (1998) **47**(9): 1140-4.
- Mizutani T, Nishikawa Y, Adachi H, Enomoto T, Ikegami H, Kurachi H, et al. Identification of estrogen receptor in human adipose tissue and adipocytes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* (1994) **78**(4): 950-4.

- Morimoto C, Tsujita T and Okuda H. Norepinephrine-induced lipolysis in rat fat cells from visceral and subcutaneous sites: role of hormone-sensitive lipase and lipid droplets. *J. Lipid Res.* (1997) **38**(1): 132-8.
- Morrone M, Giordano A, Zingaretti MC, Boiani R, De Matteis R, Kahn BB, et al. Reversible transdifferentiation of secretory epithelial cells into adipocytes in the mammary gland. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2004) **101**(48): 16801-6.
- O'Brien SN, Welter BH, Mantzke KA and Price TM. Identification of progesterone receptor in human subcutaneous adipose tissue. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* (1998) **83**(2): 509-13.
- Pedersen SB, Bruun JM, Hube F, Kristensen K, Hauner H and Richelsen B. Demonstration of estrogen receptor subtypes alpha and beta in human adipose tissue: influences of adipose cell differentiation and fat depot localization. *Mol. Cell Endocrinol.* (2001) **182**(1): 27-37.
- Pedersen SB, Hansen PS, Lund S, Andersen PH, Odgaard A and Richelsen B. Identification of oestrogen receptors and oestrogen receptor mRNA in human adipose tissue. *Eur. J. Clin. Invest.* (1996) **26**(4): 262-9.
- Pond CM and Mattacks CA. The effects of noradrenaline and insulin on lipolysis in adipocytes isolated from nine different adipose depots of guinea-pigs. *Int J Obes* (1991) **15**(9): 609-18.
- Portillo MP, Simon E, Garcia-Calonge MA and Del Barrio AS. Effect of high-fat diet on lipolysis in isolated adipocytes from visceral and subcutaneous WAT. *Eur. J. Nutr.* (1999) **38**(4): 177-182.
- Portillo MP, Villaro JM, Torres MI and Macarulla MT. In vivo lipolysis in adipose tissue from two anatomical locations measured by microdialysis. *Life Sci.* (2000) **67**(4): 437-445.
- Preiss-Landl K, Zimmermann R, Hammerle G and Zechner R. Lipoprotein lipase: the regulation of tissue specific expression and its role in lipid and energy metabolism. *Curr Opin Lipidol* (2002) **13**(5): 471-81.
- Prunet-Marcassus B, Moulin K, Carmona MC, Villarroya F, Penicaud L and Casteilla L. Inverse distribution of uncoupling proteins expression and oxidative capacity in mature adipocytes and stromal-vascular fractions of rat white and brown adipose tissues. *FEBS Lett.* (1999) **464**(3): 184-8.

- Quevedo S, Roca P, Pico C and Palou A. Sex-associated differences in cold-induced UCP1 synthesis in rodent brown adipose tissue. *Pflugers Arch* (1998) **436**(5): 689-95.
- Ramirez I, Llobera M and Herrera E. Circulating triacylglycerols, lipoproteins, and tissue lipoprotein lipase activities in rat mothers and offspring during the perinatal period: effect of postmaturity. *Metabolism* (1983) **32**(4): 333-41.
- Ramos MP, Crespo-Solans MD, del Campo S, Cacho J and Herrera E. Fat accumulation in the rat during early pregnancy is modulated by enhanced insulin responsiveness. *Am J Physiol Endocrinol Metab* (2003) **285**(2): E318-28.
- Ramos P and Herrera E. Comparative responsiveness to prolonged hyperinsulinemia between adipose-tissue and mammary-gland lipoprotein lipase activities in pregnant rats. *Early Pregnancy* (1996) **2**(1): 29-35.
- Ramos P, Martin-Hidalgo A and Herrera E. Insulin-induced up-regulation of lipoprotein lipase messenger ribonucleic acid and activity in mammary gland. *Endocrinology* (1999) **140**(3): 1089-93.
- Rebuffe-Scrive M, Andersson B, Olbe L and Bjorntorp P. Metabolism of adipose tissue in intraabdominal depots of nonobese men and women. *Metabolism* (1989) **38**(5): 453-8.
- Rijnkels M and Rosen JM. Adenovirus-Cre-mediated recombination in mammary epithelial early progenitor cells. *J Cell Sci* (2001) **114**(Pt 17): 3147-53.
- Roca P, Rodriguez AM, Oliver P, Bonet ML, Quevedo S, Pico C, et al. Brown adipose tissue response to cafeteria diet-feeding involves induction of the UCP2 gene and is impaired in female rats as compared to males. *Pflugers Arch* (1999) **438**(5): 628-34.
- Rodriguez E, Monjo M, Rodriguez-Cuenca S, Pujol E, Amengual B, Roca P, et al. Sexual dimorphism in the adrenergic control of rat brown adipose tissue response to overfeeding. *Pflugers Arch* (2001) **442**(3): 396-403.
- Rodriguez E, Ribot J, Rodriguez AM and Palou A. PPAR-gamma2 expression in response to cafeteria diet: gender- and depot-specific effects. *Obes Res* (2004) **12**(9): 1455-63.
- Rodriguez-Cuenca S, Monjo M, Proenza AM and Roca P. Depot differences in steroid receptor expression in adipose tissue: possible role of the local steroid milieu. *Am J Physiol Endocrinol Metab* (2005) **288**(1): E200-7.

- Rothwell NJ and Stock MJ. Regulation of energy balance in two models of reversible obesity in the rat. *J Comp Physiol Psychol* (1979) **93**(6): 1024-34.
- Rothwell NJ and Stock MJ. Effects of feeding a palatable 'cafeteria' diet on energy balance in young and adult lean (+/?) Zucker rats. *Br J Nutr* (1982) **47**(3): 461-71.
- Rudolph MC, McManaman JL, Hunter L, Phang T and Neville MC. Functional development of the mammary gland: use of expression profiling and trajectory clustering to reveal changes in gene expression during pregnancy, lactation, and involution. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* (2003) **8**(3): 287-307.
- Ryan EA, O'Sullivan MJ and Skyler JS. Insulin action during pregnancy. Studies with the euglycemic clamp technique. *Diabetes* (1985) **34**(4): 380-9.
- Saunders C and Limbird LE. Localization and trafficking of alpha2-adrenergic receptor subtypes in cells and tissues. *Pharmacol Ther* (1999) **84**(2): 193-205.
- Sclafani A and Springer D. Dietary obesity in adult rats: similarities to hypothalamic and human obesity syndromes. *Physiol Behav* (1976) **17**(3): 461-71.
- Serrero G and Lepak N. Endocrine and paracrine negative regulators of adipose differentiation. *Int J Obes Relat Metab Disord* (1996) **20 Suppl 3**: S58-64.
- Smith GH and Medina D. A morphologically distinct candidate for an epithelial stem cell in mouse mammary gland. *J Cell Sci* (1988) **90 (Pt 1)**: 173-83.
- Soloveva V, Graves RA, Rasenick MM, Spiegelman BM and Ross SR. Transgenic mice overexpressing the beta 1-adrenergic receptor in adipose tissue are resistant to obesity. *Mol. Endocrinol.* (1997) **11**(1): 27-38.
- Sorenson RL and Brelje TC. Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: beta-cell growth, enhanced insulin secretion and the role of lactogenic hormones. *Horm Metab Res* (1997) **29**(6): 301-7.
- Souza SC, de Vargas LM, Yamamoto MT, Lien P, Franciosa MD, Moss LG, et al. Overexpression of perilipin A and B blocks the ability of tumor necrosis factor alpha to increase lipolysis in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* (1998) **273**(38): 24665-9.
- Sztalryd C and Kraemer FB. Differences in hormone-sensitive lipase expression in white adipose tissue from various anatomic locations of the rat. *Metabolism* (1994) **43**(2): 241-7.

- Tansey JT, Sztalryd C, Gruia-Gray J, Roush DL, Zee JV, Gavrilova O, et al. Perilipin ablation results in a lean mouse with aberrant adipocyte lipolysis, enhanced leptin production, and resistance to diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2001) **98**(11): 6494-9.
- Tavernier G, Galitzky J, Valet P, Remaury A, Bouloumie A, Lafontan M, et al. Molecular mechanisms underlying regional variations of catecholamine- induced lipolysis in rat adipocytes. *Am. J. Physiol.* (1995) **268**(6 Pt 1): E1135-42.
- Valet P, Grujic D, Wade J, Ito M, Zingaretti MC, Soloveva V, et al. Expression of human alpha 2-adrenergic receptors in adipose tissue of beta 3-adrenergic receptor-deficient mice promotes diet-induced obesity. *J Biol Chem* (2000) **275**(44): 34797-802.
- van Biesen T, Hawes BE, Raymond JR, Luttrell LM, Koch WJ and Lefkowitz RJ. G(o)-protein alpha-subunits activate mitogen-activated protein kinase via a novel protein kinase C-dependent mechanism. *J Biol Chem* (1996) **271**(3): 1266-9.
- van Harmelen V, Dicker A, Ryden M, Hauner H, Lonngqvist F, Naslund E, et al. Increased lipolysis and decreased leptin production by human omental as compared with subcutaneous preadipocytes. *Diabetes* (2002) **51**(7): 2029-36.
- Vasselli JR, Cleary MP and Van Itallie TB. Modern concepts of obesity. *Nutr Rev* (1983) **41**(12): 361-73.
- Wade G. Sex hormones, regulatory behaviours, and body weight. In: *Rosenblatt JS, Hinde RA, Shaw E, Beer CG (eds) Advances in the study of behaviour. Academic Press, NY, p 201* (1976).
- Xu XF, De Pergola G and Bjorntorp P. Testosterone increases lipolysis and the number of beta-adrenoceptors in male rat adipocytes. *Endocrinology* (1991) **128**(1): 379-82.
- Yeaman SJ, Smith GM, Jepson CA, Wood SL and Emmison N. The multifunctional role of hormone-sensitive lipase in lipid metabolism. *Adv Enzyme Regul* (1994) **34**: 355-70.

7. Anexo / Appendix

MANUSCRIPT VI

Sexual dimorphism in the adrenergic control of rat brown adipose tissue response to overfeeding.

Rodriguez E, Monjo M, Rodriguez-Cuenca S, Pujol E, Amengual B, Roca P, Palou A.
Pflugers Arch (2001) 442(3):396-403.

MANUSCRIPT VII

Sex-dependent thermogenesis, differences in mitochondrial morphology and function, and adrenergic response in brown adipose tissue.

Rodríguez-Cuenca S, Pujol E, Justo R, Frontera M, Oliver J, Gianotti G, Roca P.
J Biol Chem (2002) 277(45):42958-63.

MANUSCRIPT VIII

Gender-related differences in morphology and thermogenic capacity of brown adipose tissue mitochondrial subpopulations.

Justo R, Frontera M, Pujol E, Rodríguez-Cuenca S, Lladó I, García-Palmer FJ, Roca P, Gianotti M.

Life Sci (2005) 76(10):1147-58.

MANUSCRIPT IX

Rat brown adipose tissue thermogenic features are altered during mid-pregnancy.

Frontera M, Pujol E, Rodríguez-Cuenca S, Català-Niell A, Roca P, García-Palmer FJ, Gianotti M.

Cell Physiol Biochem. 2005;15(5):203-10

