



**Universitat de les Illes Balears**

Facultat de Ciències

Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut

Laboratori de Biologia Molecular, Nutrició i Biotecnologia – Nutrigenòmica

**La fura (*Mustela putorius furo*) com a model  
experimental per a l'estudi dels efectes del  $\beta$ -carotè en  
obesitat i càncer**

Memòria per optar al grau de

Doctora per la Universitat de les Illes Balears

Programa de doctorat de Nutrició i Metabolisme

Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut de la UIB

Presentada per

**María Antonia Fuster Roca**

Palma, març de 2009

**Obra i disseny de la coberta:** Ángel Hernández Hernández

## Vist-i-plau dels directors

Dra. Catalina Picó Segura  
Professora titular d'Universitat  
de Bioquímica i Biologia Molecular

Prof. Dr. Andreu Palou Oliver  
Catedràtic d'Universitat  
de Bioquímica i Biologia Molecular

La doctoranda

María Antonia Fuster Roca



*Science is a wonderful thing if one  
does not have to earn one's living at it  
Albert Einstein (1879-1955)*

*A la meva família i amics*



## Agraïments

Ara que tenc l'ocasió, vull expressar el meu agraïment a les persones que d'una manera o altra han contribuït a què aquesta tesi *arribàs a bon port*.

Als meus directors, el Professor Andreu Palou, per haver confiat en mi quan ni jo mateixa ho feia, per haver-me permès formar part del seu grup de recerca i supervisar la meva feina, i la Dra. Catalina Picó, igualment per haver confiat en mi i introduir-me al grup de recerca, i per haver-me tutoritzat en aquest treball dia a dia, sempre trobant un moment per atendre'm.

A les Dres. Paula Oliver i Juana Sánchez, perquè sense elles hagués estat senzillament impossible dur a terme tots els experiments de laboratori.

Als demés membres del grup, els Drs. i Dres. Lluïsa Bonet, Francisca Serra, Joan Ribot, Ana Rodríguez i Olga Miralles, per haver-me donat consells i ànims per desenvolupar aquesta tasca que ara arriba al final però que a mi no se m'ha fet curta ni fàcil. Vull agrair en especial a n'Enzo la feina que ha fet en els experiments d'immunohistoquímica i a na Lucrecia que, malgrat ja no formi part del nostre grup, em va ajudar molt en les tasques d'estabulari al principi de la meva etapa de doctoranda, de la mateixa manera que als *meus* alumnes col·laboradors, que han estat amb nosaltres en diferents moments d'aquest treball.

*Thanks to Drs. Jaap Keijer and Nicole Franssen and the rest of colleagues from Food Bioactives Group at RIKILT Institute (The Netherlands) for giving me the chance to work with them, learning so much about molecular biology and to make me feel like at home.*

Als excompanys del grup que ja han pres un altre camí, els Drs. Enrique Rodríguez i Francesc Felip per haver tengut molta paciència amb mi i haver-me guiat en l'aprenentatge de vàries tècniques. Al recent Dr. Pep Mercader per haver compartit inquietuds, especialment als primers temps.

Als companys del dia a dia de la meva darrera època de laboratori, la Dra. Teresa Priego, en Toni, na Pilar, en Jaume, na Maria, na Núria, n'Ona, n'Aixa, en Sebastià, etc, perquè segur que en un moment o altre han contribuït a què aquest projecte es fes endavant.

Agrair també als qui m'han donat suport fora del laboratori, especialment a na Maria Gelabert, companya de laboratori durant una primera etapa i en certa manera responsable de què jo m'introduís en aquest món; a en Jaume Payeras per tenir sempre en ment alguna cosa que em fes il·lusió després d'un dia dur de laboratori o càlculs que no sortien; i molt especialment a en Jaume Perelló, per tenir-lo al meu costat sempre que l'he necessitat i a tants d'altres de diferents entorns simplement per la seva amistat.

A n'Àngel Hernández i família, per haver-me deixat emprar una de les seves obres a la portada i haver-me ajudat en el disseny de la coberta.

A en Laureà, na Marga i en Tomeu, companys de feina de l'institut, per haver col·laborat en la correcció lingüística, i als demés, pels bons moments que passam junts.

I per acabar, l'agraïment més fort per a la meva família, els meus pares i germana, que m'han animat sempre a no abandonar el camí, malgrat m'hagi qüestionat sèriament deixar-lo, perquè, especialment gràcies a ells, m'hi he mantingut fins al final que ara s'acosta. La tesi en gran part és vostra.



## Índex

Resum/Abstract.....	IX
Llistat d'articles originals .....	XI
Índex d'abreviatures més emprades .....	XII
1. Introducció .....	1
1.1. La vitamina A .....	3
1.1.1. El $\beta$ -carotè .....	3
1.1.2. Metabolisme del $\beta$ -carotè .....	4
1.1.3. L'àcid retinoic i els receptors de retinoides .....	6
1.2. Efectes del $\beta$ -carotè sobre el cicle cel·lular al pulmó .....	7
1.2.1. Estudis observacionals en humans.....	7
1.2.2. Estudis d'intervenció amb $\beta$ -carotè en humans .....	7
1.2.3. Estudis previs d'administració de $\beta$ -carotè com a suplement en animals de laboratori. Elecció de la fura com a model animal .....	9
1.2.4. El benzo[a]pirè .....	11
1.2.5. Cicle cel·lular i principals gens o factors implicats en el seu control .....	11
1.3. Efectes de la vitamina A sobre la despesa energètica .....	14
1.3.1. L'obesitat i la regulació del pes corporal.....	14
1.3.2. El teixit adipós .....	14
1.3.3. La proteïna UCP1.....	16
1.3.3.1. La termogènesi induïda per la dieta i pel fred .....	17
1.3.3.2. Regulació de la UCP1 per nutrients. Efectes de la vitamina A .....	19
1.4. Efectes de la vitamina A sobre altres mecanismes implicats en el control del pes corporal .....	20
1.4.1. Vitamina A i adipogènesi.....	20
1.4.2. Vitamina A i adipositat corporal.....	21
2. Objectius .....	23
3. Disseny experimental.....	27
4. Resultats i discussió .....	33
4.1. <u>Effects of 6-month daily supplementation with oral beta-carotene in combination         or not with benzo[a]pyrene on cell cycle markers in the lung of ferrets.</u> Fuster MA, Picó C, Sánchez J, Oliver P, Zingaretti MC, Murano I, Morroni M, Hoeller U, Goralczyk R, Cinti S, Palou A. Journal of Nutritional Biochemistry 19: 295-304 (2008).....	35
4.2. <u>Morphology of ferret subcutaneous adipose tissue after 6-month daily         supplementation with oral beta-carotene.</u> Murano I, Morroni M, Zingaretti MC, Oliver P, Sánchez J, Fuster MA, Picó C, Palou A, Cinti S. Biochimica et Biophysica Acta 1740: 305-312 (2005).....	47

4.3. <u>UCP1 and oxidative capacity of adipose tissue in adult ferrets (<i>Mustela putorius furo</i>)</u> . Fuster MA, Oliver P, Sánchez J, Picó C, Palou A. Biochemistry and Physiology. Part A. En premsa (2009).....	57
4.4. <u>Opposite effects of beta-carotene and retinoic acid supplementation on adipose tissue thermogenic capacity in ferrets</u> . Sánchez J, Fuster MA, Oliver P, Picó C, Palou A. En vies de publicació.....	67
5. Recapitulació .....	93
5.1. Efectes del $\beta$ -carotè sobre marcadors de proliferació cel·lular al pulmó .....	95
5.2. Efectes del $\beta$ -carotè sobre l'adipositat i l'expressió de la proteïna UCP1 al teixit adipós.....	96
6. Conclusions .....	101
7. Bibliografia .....	107
Annex: detalls de les tècniques utilitzades.....	115



## La fura (*Mustela putorius furo*) com a model experimental per a l'estudi dels efectes del $\beta$ -carotè en obesitat i càncer

Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut

Facultat de Ciències – Universitat de les Illes Balears

María Antonia Fuster Roca

### Resum

El  $\beta$ -carotè és un dels principals carotenoides amb activitat de provitamina A en els mamífers. Està present de manera natural a certs vegetals i té interès per ell mateix i com a precursor de la vitamina A. Diversos estudis observacionals en humans han demostrat que les persones que consumeixen una dieta rica en fruita i verdura i que tenen nivells circulants elevats de  $\beta$ -carotè estan més protegits envers el càncer de pulmó; ara bé, estudis d'intervenció en humans subministrant directament aquest compost han apuntat justament en sentit oposat.

La fura (*Mustela putorius furo*) representa un model experimental idoni per estudiar els efectes de la ingesta de  $\beta$ -carotè ja que, a diferència dels rosegadors, aquests animals l'absorbeixen (en part) en forma intacta, de manera semblant al que passa a humans. Per això s'ha elegit aquest model experimental, la fura, per esbrinar els possibles efectes, beneficiosos o adversos, de la ingesta de  $\beta$ -carotè sobre el desenvolupament de càncer de pulmó, determinant els seus efectes sobre marcadors de proliferació cel·lular a aquest teixit. D'altra banda, considerant la capacitat del  $\beta$ -carotè d'incrementar la capacitat termogènica a cultius primaris d'adipòcits marrons de ratolí, i els efectes del seu derivat, l'àcid retinoic, sobre el balanç energètic a rosegadors (disminueix l'adipositat i augmenta la capacitat termogènica), es va plantejar també estudiar els seus efectes sobre l'adipositat i la capacitat termogènica al mateix model animal.

Els resultats obtinguts mostren que el  $\beta$ -carotè administrat en una formulació concreta acompanyat d'altres antioxidants ( $\alpha$ -tocoferol i palmitat d'ascorbil) no resulta en un augment dels nivells d'expressió de marcadors de proliferació cel·lular, ni apareixen senyals evidents de lesió per metaplàsia escamosa al pulmó; a més, el  $\beta$ -carotè administrat juntament amb un agent carcinogen (el benzo[a]pirè) és capaç de prevenir l'increment d'expressió de marcadors de proliferació cel·lular al pulmó. Aquests resultats suggereixen que l'efecte promotor o protector de càncer de pulmó del  $\beta$ -carotè depèn, no només de la dosi administrada, sinó també de la matriu en què aquest compost és administrat, de manera que la combinació de  $\beta$ -carotè amb  $\alpha$ -tocoferol i palmitat d'ascorbil no indueix efectes adversos al pulmó de la fura.

D'altra banda, s'ha observat que les característiques dels diferents dipòsits de teixit adipós a les fures són diferents de les dels rosegadors. En concret, el teixit adipós interescapular (amb característiques de teixit adipós marró als rosegadors) té a la fura característiques de teixit adipós blanc, mentre que el teixit adipós retroperitoneal, típicament blanc a rosegadors, té una proporció destacable d'adipòcits multiloculars amb característiques semblants als adipòcits marrons. L'estímul del fred produeix en aquest animal un augment del contingut d'UCP1 i de la proporció d'adipòcits multiloculars als teixits adiposos retroperitoneal i interescapular. Ara bé, el  $\beta$ -carotè administrat de manera crònica en dosis farmacològiques resulta en un major guany de pes corporal i una major adipositat, així com en un descens de la capacitat termogènica del teixit adipós. Aquests efectes són oposats als que s'observen per l'àcid retinoic a la fura (i els descrits prèviament a rosegadors) quant s'administra de manera aguda, ja que disminueix lleugerament l'adipositat i augmenta el contingut d'UCP1; la qual cosa confirma que els efectes prèviament descrits del  $\beta$ -carotè estimulants la capacitat termogènica a cultius primaris d'adipòcits marrons de ratolí són probablement dependents de la seva conversió en àcid retinoic. Per tant, aquests resultats obtinguts en fures (i probablement més extrapolables a humans que els obtinguts en ratolins) poden tenir implicacions de cara a considerar els aliments rics en  $\beta$ -carotè com a potencials reguladors de la termogènesi i la seva utilitat en el control de l'acumulació de greix corporal.



**The ferret (*Mustela putorius furo*) as an experimental model to study  
 $\beta$ -carotene effects in obesity and cancer**

Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut

Facultat de Ciències – Universitat de les Illes Balears

María Antonia Fuster Roca

**Abstract**

$\beta$ -carotene is one of the main carotenoids with provitamin A activity in mammals. It is a naturally occurring carotenoid in vegetables and it is interesting in itself and as a vitamin A precursor as well. Several observational studies in humans demonstrated that people with a diet rich in fruits and vegetables and with high  $\beta$ -carotene levels in plasma are protected against lung cancer; but interventional studies in humans giving this compound alone pointed just in the opposite direction.

The ferret (*Mustela putorius furo*) represents a suitable experimental model to study the effects of  $\beta$ -carotene intake because, unlike rodents, these animals absorb at least in part some intact  $\beta$ -carotene, which is similar to what occurs in humans. Because of this the ferret was chosen as an experimental model to determine the possible beneficial or adverse effects from  $\beta$ -carotene intake on lung cancer development, determining its effects on cellular proliferation markers on this tissue. In addition, taking into account that  $\beta$ -carotene can increase thermogenic capacity of brown adipocytes from mouse in primary culture and the effects of its derivative, retinoic acid, over energy balance in rodents (it decreases adiposity and increases thermogenic capacity), it was also considered interesting to study its effects on adiposity and thermogenic capacity on the same animal model.

Results show that  $\beta$ -carotene given in a formulation containing other antioxidants ( $\alpha$ -tocopherol and ascorbyl palmitate) does not result in an increase of cellular proliferation markers expression, neither in evident signals of squamous metaplasia in lung; moreover,  $\beta$ -carotene given together with a carcinogenic agent (benzo[a]pyrene) can prevent from an increased cellular proliferation markers expression in lung. These results suggest that the promoting or protective effect from  $\beta$ -carotene in lung cancer depends not only on the given dose but also on the matrix in which  $\beta$ -carotene is supplied, so that the combination of  $\beta$ -carotene with  $\alpha$ -tocopherol and ascorbyl palmitate does not induce adverse effects in ferret's lung.

On the other hand differences were observed between characteristics from different adipose tissue depots from ferrets compared to those from rodents. Specifically, the interscapular adipose tissue, which has brown adipose tissue characteristics in rodents, resembles more to white adipose tissue in the ferret, while the retroperitoneal adipose tissue from ferrets, typically white in rodents, has an important proportion of multilocular adipocytes with more similar characteristics to brown adipocytes. Cold stimulus increases UCP1 content and multilocular adipocytes proportion in the retroperitoneal and interscapular adipose tissues in the ferret. Nevertheless  $\beta$ -carotene given chronically in pharmacological doses results in a higher body weight gain and a higher adiposity and in a decrease from thermogenic capacity in adipose tissue. These effects are opposite from those observed for retinoic acid in ferrets (and those described previously in rodents) when given as an acute treatment since it slightly decreases adiposity and increases UCP1 content, which confirms that the previously described effects of  $\beta$ -carotene stimulating thermogenic capacity in brown adipocytes from mouse in primary culture are probably dependent on its conversion to retinoic acid. Therefore, these results obtained in ferrets (and probably more extrapolable to humans than those obtained in mouse) may have some implications when considering  $\beta$ -carotene rich aliments as potential thermogenesis regulators and its use in controlling the accumulation of body fat.

Aquesta tesi es basa en els següents manuscrits originals:

I. **Fuster MA**, Picó C, Sánchez J, Oliver P, Zingaretti MC, Murano I, Morroni M, Hoeller U, Goralczyc R, Cinti S, Palou A. Effects of 6-month daily supplementation with oral beta-carotene in combination or not with benzo[a]pyrene on cell cycle markers in the lung of ferrets. Journal of Nutritional Biochemistry 19:295-304 (2008)

II. Murano I, Morroni M, Zingaretti MC, Oliver P, Sánchez J, **Fuster MA**, Picó C, Palou A, Cinti S. Morphology of ferret subcutaneous adipose tissue after 6-month daily supplementation with oral beta-carotene. Biochimica et Biophysica Acta 1740:305-312 (2005)

III. **Fuster MA**, Oliver P, Sánchez J, Picó C, Palou A. UCP1 and oxidative capacity of adipose tissue in adult ferrets (Mustela putorius furo). Biochemistry and Physiology. Part A. En premsa (2009)

IV. Sánchez J, **Fuster MA**, Oliver P, Picó C, Palou A. Opposite effects of beta-carotene and retinoic acid supplementation on adipose tissue thermogenic capacity in ferrets. En vies de publicació

Índex d'abreviatures més emprades:

- ADN: àcid desoxiribonucleic
- AP1: proteïna activadora 1 (*Activator Protein 1*)
- AR: àcid retinoic
- ARNm: àcid ribonucleic missatger
- BC:  $\beta$ -carotè
- BP: benzo[a]pirè
- COX: citocrom c oxidasa
- NA: noradrenalina
- PCNA: antigen nuclear de cèl·lules en proliferació (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*)
- PPAR: receptors activats per proliferadors peroxisomals (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*)
- RAR: receptor d'àcid retinoic (*Retinoic Acid Receptor*)
- RARE: element de resposta a àcid retinoic (*Retinoic Acid Response Element*)
- RXR: receptor de retinoides (*Retinoid X Receptor*)
- TAB: teixit adipós blanc
- TAM: teixit adipós marró
- UCP1: proteïna desacobladora 1 (*UnCoupling Protein 1*)

## **1. INTRODUCCIÓ**





Els nutrients que contenen els aliments no sols serveixen per aportar-nos energia (funció principal dels macronutrients), sinó que també poden regular l'expressió gènica i processos derivats i, per tant, influir positivament o negativament en el desenvolupament d'algunes malalties. La vitamina A és un important nutrient modulador de l'expressió gènica que regula els processos de proliferació i diferenciació de nombrosos tipus cel·lulars [6, 7]. Aquest treball s'emmarca en alguns dels efectes que pot tenir un micronutrient (la vitamina A o el  $\beta$ -carotè (BC), el seu precursor) sobre el teixit pulmonar i el teixit adipós, dins una de les principals línies que desenvolupa el nostre grup de recerca, al Laboratori de Biologia Molecular, Nutrició i Biotecnologia-Nutrigenòmica de la UIB.

## 1.1 LA VITAMINA A

La vitamina A és una vitamina liposoluble que es troba als greixos animals majoritàriament en forma d'èsters de retinol. Als vegetals no s'hi troba vitamina A com a tal, però sí carotenoides, alguns dels quals poden servir com a precursors de la vitamina A als animals. Les formes actives de la vitamina A inclouen l'alcohòlica (el retinol), l'aldehídica (el retinal), que és la forma activa al cicle visual, i l'àcid retinoic (AR), que és la forma àcida de vitamina A, molt activa en la regulació de l'expressió gènica.

### 1.1.1 El $\beta$ -carotè

El BC (fig. 1) és un pigment natural de la família dels carotenoides que es troba a certes verdures que formen part de la nostra dieta, com la pastanaga, el moniato, la carabassa, el bròquil, els pebres, el raïm, la papaia, el préssec, el carabassó, els espinacs i les verdures de fulles de color verd obscur en general (revisat a [25, 38]).

La família dels carotenoides està formada pel BC, juntament amb l' $\alpha$ -carotè, el licopè, la luteïna i la  $\beta$ -criptoxantina, essent el BC un dels carotenoides més abundants de la dieta humana i el principal i més potent precursor de la vitamina

A de tots els carotenoides que poden donar lloc a aquesta vitamina (revisat a [25]).

Aquest compost s'ha estat utilitzant com a colorant de menjars i begudes (additiu E160). Per exemple, afegit a margarines d'origen vegetal per compensar-ne la seva deficiència en vitamina A, entre molts altres usos. Fins i tot s'ha desenvolupat per enginyeria genètica (inicialment de forma experimental) una varietat d'arròs (l'anomenat «arròs daurat») que conté BC i que podria ser d'utilitat per combatre la deficiència en vitamina A als països subdesenvolupats [8].

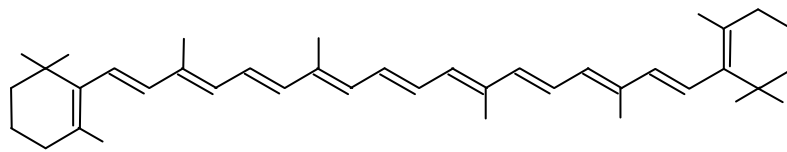


Figura 1. Estructura de la molècula de  $\beta$ -carotè tot-*trans*

### 1.1.2 Metabolisme del $\beta$ -carotè

Als mamífers s'han descrit dues rutes possibles per a la conversió del BC en retinoides (fig. 2): la ruptura central per la  $\beta$ -carotè-15,15'-dioxigenasa que dona lloc a dues molècules de retinal i la ruptura excèntrica que dona lloc a dues molècules de  $\beta$ -apo-carotenals de diferent longitud (revisat a [79]). La ruptura excèntrica pot ser resultat d'una ruptura controlada per enzims específics [88]; [40], però també pot ser produïda per la ruptura aleatòria provocada per lipooxigenases [99], per radicals lliures o fins i tot per autooxidació (revisat a [100]).

El retinal produït per ruptura central pot ser oxidat a àcid retinoic per l'enzim aldehid deshidrogenasa o bé reduït a retinol per l'enzim retinal reductasa. Finalment, els enzims lecitin:retinol acitransferasa i acil-coA:retinol acitransferasa permeten l'esterificació del retinol per donar lloc als èsters de retinol (per ex. palmitat de retinil) [61, 31], que és la principal forma per ser emmagatzemada (revisat a [11]).

Per altra banda, els  $\beta$ -apo-carotenals formats per ruptura excèntrica són oxidats als corresponents àcids  $\beta$ -apo-carotenoics, que acaben per convertir-se en àcid retinoic.

La ruptura excèntrica per oxidació simple es veu inhibida per la presència d'antioxidants com l'àcid ascòrbic i l' $\alpha$ -tocoferol [31, 50, 61], substàncies que es troben en nivells baixos a l'ambient carregat de radicals lliures dels pulmons dels fumadors [83, 103]. De fet, en presència de concentracions adequades d'antioxidants, s'ha vist que el BC es converteix quasi exclusivament a retinal per ruptura central, mentre que en la seva absència pot ser convertit en  $\beta$ -apo-carotenals. També s'ha descrit que els productes de la ruptura excèntrica indueixen els enzims del citocrom P450, resultant en una deficiència local d'àcid retinoic, i a més, faciliten la unió de metabòlits del benzo[a]pirè a l'ADN, la qual cosa augmenta el dany de l'ADN i possiblement condueix a càncer de pulmó [79].

A més a més, l'isòmer  $\beta$ -carotè tot-*trans* pot donar lloc als isòmers 9-*cis* i 13-*cis* per isomerització geomètrica.

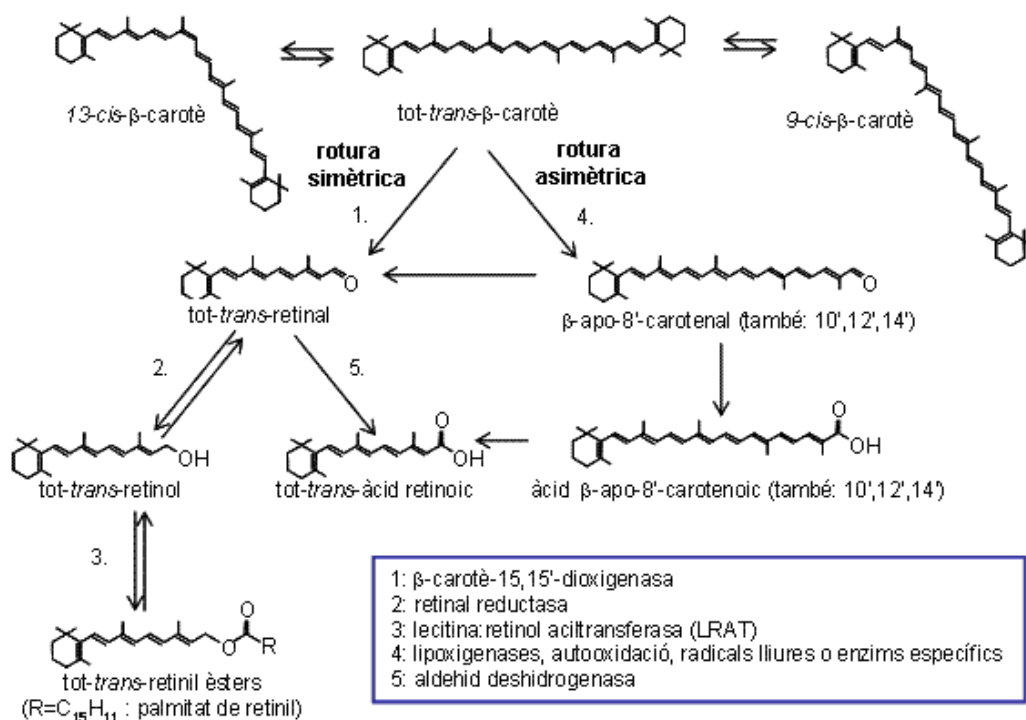


Figura 2. Rutes del metabolisme del  $\beta$ -carotè, enzims i altres factors implicats. Extret de [29]

### 1.1.3 L'àcid retinoic i els receptors de retinoides

L'AR es considera la forma activa de la vitamina A en la regulació de l'expressió gènica [6, 7], encara que recentment s'ha observat que el retinaldehid i el  $\beta$ -apo-14'-carotenal (un dels derivats de la ruptura asimètrica del BC) també poden modular l'activitat d'alguns factors de transcripció [105, 106]. La major part dels efectes biològics de l'AR impliquen canvis en l'expressió gènica de les cèl·lules diana per mitjà de l'activació dels receptors de retinoides, que són factors de transcripció dependents de lligam que pertanyen a la superfamília de receptors nuclears.

Existeixen dues famílies de receptors de retinoides: els receptors d'àcid retinoic (RAR, de l'anglès *retinoic acid receptor*) i els receptors de retinoides (RXR, de l'anglès *retinoid X receptor*). Els RAR responen als isòmers 9-*cis* i tot-*trans* de l'AR. Els RXR sembla que responen específicament a l'isòmer 9-*cis*, i també a altres composts, com àcids grassos insaturats [97]. S'han descrit tres subtipus diferents de cada família,  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ , que són codificats per gens diferents i mostren uns patrons d'expressió específics per a cada teixit i etapa del desenvolupament [55, 56].

Els RAR s'uneixen en forma d'heterodímers amb RXR als elements de resposta a AR o RARE (de l'anglès, *retinoic acid response elements*) situats a la regió reguladora (promotor) dels gens sensibles a retinoides, i modulen la taxa d'inici de la transcripció d'aquests gens en funció de l'ocupació de la meitat RAR amb el seu lligand (AR tot-*trans* o 9-*cis*) [5, 7]. Es considera que, en general, els RAR:RXR reprimeixen la transcripció dels gens diana quan no tenen lligand unit [7], encara que es coneixen casos de gens reprimits per RAR d'una manera dependent de lligand. Els RXR també poden formar homodímers, que s'uneixen a un tipus particular de RARE. A més, els RXR poden heterodimeritzar amb altres membres de la superfamília de receptors nuclears, com per exemple el receptor d'hormona tiroïdal (T3R), el receptor de la vitamina D (VDR) o els receptors activats per proliferadors peroxisomals (PPAR).

Un altre mecanisme pel qual els receptors de retinoides poden afectar l'expressió gènica és per interferència dependent de lligand, positiva o negativa, amb l'activitat d'altres factors de transcripció. Un exemple ben establert és la transrepressió mútua entre els RAR units a lligand i el factor de transcripció AP1 (l'heterodímer Jun-Fos), que resulta en una inhibició de la capacitat tant d'AP1 com d'RAR de transactivar els seus respectius gens diana [3].

## **1.2 EFECTES DEL $\beta$ -CAROTÉ SOBRE EL CICLE CEL·LULAR AL PULMÓ**

### **1.2.1 Estudis observacionals en humans**

Estudis epidemiològics observacionals havien demostrat que les persones que inclouen a la seva dieta més fruites i verdures i que tenien nivells sèrics de BC més elevats, tenien un risc menor de patir malalties cardiovasculars i càncer, especialment de pulmó, i aquest fet quasi sempre s'explicava a partir de les propietats antioxidants del BC [67, 104].

### **1.2.2 Estudis d'intervenció amb $\beta$ -carotè en humans**

Per aportar proves definitives en humans de què el BC podia reduir la incidència de càncer de pulmó, durant els anys noranta es van dur a terme varis estudis d'intervenció en humans. Un d'ells fou *The Alpha-Tocopherol-Beta-Carotene (ATBC) Trial* a Finlàndia [1], un estudi doble cec, controlat amb placebo, on una població de 29133 homes fumadors de 5 o més cigarretes diàries d'entre 50 i 69 anys d'edat van ser dividits en quatre grups i a cada un d'ells, segons el grup assignat, se'l suplementava diàriament amb BC (20mg/dia),  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) (50mg/dia), la combinació de tots dos composts o amb placebo. Pel que fa a l'efecte del BC, al cap d'aproximadament sis anys, la incidència de càncer de pulmó no havia disminuït sinó que havia augmentat un 18% al grup dels individus que havien rebut suplement de BC comparat amb els que no n'havien rebut. A més, la mortalitat per càncer de pulmó i cardiopatia isquèmica havia augmentat un 8% si es comparava el grup suplementat amb BC amb el que no havia rebut aquest suplement. El BC va

mostrar tenir poc o gens d'efecte sobre altres càncers distints al de pulmó. El seguiment durà entre 5 i 8 anys.

Quasi paral·lelament, un grup independent va dur a terme un estudi similar, *The Beta-Carotene and Retinol Efficacy Trial (CARET)* als EUA, i va obtenir resultats semblants [62]. En aquest cas, considerant que els retinoides podien tenir un paper protector envers el càncer de pulmó i malalties cardiovasculars, es dugué a terme un estudi de doble cec amb placebo en 18314 homes i dones fumadors, exfumadors i treballadors d'asbest, persones amb alt risc de patir càncer de pulmó, ja que l'asbest és una substància cancerígena per inhalació [60]. Els participants foren dividits en dos grups. Als d'un grup els administraren una combinació de BC (30mg/dia) i palmitat de retinil (25000UI/dia) mentre que els participants de l'altre grup reberen placebo. El resultat als quatre anys d'administrar els suplementes fou que la incidència de càncer de pulmó als individus del grup tractat amb vitamina A augmentà un 28% mentre que el risc de mort per aquest mateix tipus de càncer ho va fer un 46%. A més, augmentà un 26% el risc de mort per malaltia cardiovascular als individus del grup tractat.

Respecte als estudis ATBC i CARET, s'han analitzat amb més detall les dades, dividint-les en subgrups per intentar esbrinar si alguns estils de vida dels subjectes estudiats podien ser responsables del risc augmentat de les malalties que, en principi, es preveia es reduïssin. Per exemple, el grup de l'ATBC va observar un efecte més marcat del BC a aquelles persones que fumaven 20 o més cigarretes al dia o les que ingerien 11 o més grams d'alcohol etílic al dia, en comparació amb aquelles que fumaven de 5 a 19 cigarretes al dia i les que prenién menys d'11 grams d'alcohol diaris [2].

Un altre estudi dut a terme pràcticament al mateix temps als EUA, el *Physicians' Health Study*, amb 22071 metges als quals se'ls administraven 50mg de BC en dies alterns, no es van trobar efectes beneficiosos ni perjudicials sobre el risc de patir càncer de pulmó, ni en els fumadors ni en els no fumadors [34].

La diferència principal entre els estudis ATBC i CARET i el *Physicians' Health Study* fou que en aquest darrer, la majoria d'individus eren no fumadors (i per

tant el nombre de casos de càncer fou baix i la potència estadística de l'estudi resultà molt limitada), però cal destacar també que els nivells de BC assolits a sèrum foren bastant inferiors que als estudis ATBC i CARET.

Com que els resultats dels estudis ATBC i CARET van ser contraris a allò que s'esperava, des d'aleshores els beneficis del BC han estat posats en dubte. De fet, a Europa, el Comitè Científic d'Alimentació Humana de la Unió Europea (i l'Autoritat Europea en Seguretat Alimentària, EFSA) mantenen que suplementos de BC de 20mg/dia o majors estan contraindicats per a persones fumadores i que no existeix prou base científica per fixar el límit màxim de BC aïllat que es pot ingerir sense que resulti perjudicial [82].

Una altra de les conseqüències de l'anàlisi efectuada per l'SCF va ser el qüestionament dels models animals de rosegadors als efectes de poder deduir-ne estàndards de toxicitat, ja que aquests animals no absorbeixen BC intacte com els humans, sinó que el seu intestí transforma en vitamina A pràcticament tot el BC que és absorbit.

### **1.2.3 Estudis previs d'administració de $\beta$ -carotè com a suplement en animals de laboratori. Elecció de la fura com a model animal**

La majoria d'estudis amb BC s'han dut a terme en rosegadors. Alguns d'aquests estudis han demostrat que el BC pot bloquejar certs processos cancerígens i inhibir el creixement de tumors (revisat a [23]). En aquests animals, el BC ingerit, una vegada travessada la paret intestinal, és convertit pràcticament en la seva totalitat en dues molècules de retinal, a causa de la gran activitat dioxigenasa que presenten [48]. En canvi, als humans, aproximadament del 20 al 75% del BC ingerit és absorbit de manera intacta [75, 92]. Per això, els rosegadors tenen 1/1000 dels nivells de carotenoides que presenten els humans en circulació, nivells que no es corresponen amb el contingut de retinoides de la dieta [92].

Encara que no hi ha cap animal que reproduïxi perfectament la situació dels humans, la fura (*Mustela putorius furo*) apareix com el model animal més apropiat per estudiar els efectes del BC.

La fura és un mamífer carnívor que pertany a la família *Mustelidae*, com la mostela, la mofeta o el visó, entre d'altres (fig.3). Presenta cos i cua llargs, amb 4 potes curtes i musculades. La llargària mitjana d'una fura adulta és de 44 a 46cm (des del nas fins a l'extrem de la cua) i el seu pes pot arribar als 1600g en el cas dels mascles i 750g en el cas de les femelles, amb fluctuacions del 30-40% segons l'època de l'any.



Figura. 3. Fura (*Mustela putorius furo*)

La idoneïtat de la fura en estudis amb BC ve donada perquè aquest animal és més similar als humans que els rosegadors, almenys en termes d'absorció de BC intacte, d'acumulació de BC al pulmó i a altres teixits, de formació de metabòlits oxidatius del BC i de patologies induïdes per fum de tabac [79].

De fet, la fura ha estat utilitzada prèviament com a model animal per altres autors [49, 93] per estudiar els efectes beneficiosos o adversos de l'administració de BC sobre el càncer de pulmó. Aquests autors han demostrat que el suplement oral amb una dosi farmacològica (2,4mg BC/kg pes corporal/dia, que equivaldria a 30mg/dia a una persona de 70kg) condueix a metaplàsia escamosa (una lesió precancerígena) al pulmó i augmenta la proliferació cel·lular. Aquests efectes són encara més accentuats quan es combina aquesta dosi amb el fum del tabac. En canvi, determinaren que la suplementació amb una dosi fisiològica (0,43mg BC/kg pes corporal/dia, que equivaldria a 6mg/dia a una persona de 70kg) no mostrava aquests efectes i fins i tot podia resultar protectora envers els danys causats pel fum del tabac. El BC utilitzat per aquests autors va ser BC cristal·lí pur (Tipus IV, Sigma).



### 1.2.4 El benzo[a]pirè

El benzo[a]pirè (BP) és un carcinogen important que es troba al fum de les cigarretes de tabac [33].

Químicament es tracta d'un hidrocarbur policíclic aromàtic (fig. 4). És el carcinogen més estudiat d'aquest tipus d'hidrocarburs i és utilitzat moltes vegades com a prototip en estudis toxicològics. La toxicitat d'aquest compost és desenvolupada moltes vegades no per ell mateix, sinó per intermediaris reactius formats en el metabolisme oxidatiu del compost. Aquests intermediaris són els que solen reaccionar amb les macromolècules, provocant alteracions a l'estructura i funció de les cèl·lules diana [57].

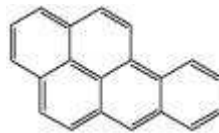


Figura 4. Estructura de la molècula de benzo[a]pirè

Aquest compost ha estat utilitzat en aquesta tesi per simular els efectes que produeix en l'organisme el fum de les cigarretes de tabac ja que és el principal compost del fum del tabac amb efectes carcinogènics. Tot i que es tracta només d'una aproximació al fum del tabac (ja que aquest conté moltes més substàncies potencialment carcinògenes), el fet d'utilitzar aquest compost permet tenir les condicions de l'experiment més controlades.

### 1.2.5 Cicle cel·lular i principals gens o factors implicats en el seu control

Les cèl·lules somàtiques segueixen un cicle en el qual es poden distingir bàsicament quatre fases:  $G_1$ , S,  $G_2$  i M (fig. 5). A la fase S es replica el material genètic i a la fase M té lloc la mitosi o divisió cel·lular; les fases  $G_1$  i  $G_2$  representen els intervals o lapses de temps entre aquests dos processos principals. A la fase  $G_1$  existeix la possibilitat d'una sortida del cicle per a què la

cèl·lula entri en un estat de latència ( $G_0$ ) on no es divideix i té la possibilitat de diferenciar-se [71].

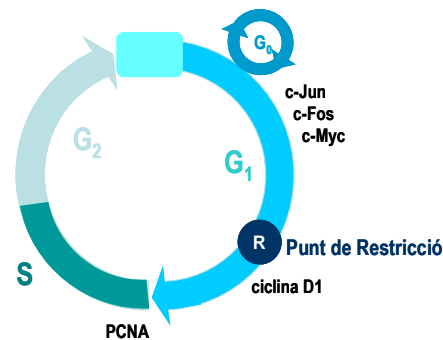


Figura 5. Esquema del cicle cel·lular i punts sobre els que actuen alguns dels factors que el regulen

Als organismes pluricel·lulars hi ha d'haver un control precís del creixement i la diferenciació cel·lular, de manera que el nombre de cèl·lules i el grau de diferenciació d'un determinat teixit es regula per l'equilibri entre la proliferació, la diferenciació i l'apoptosi, processos que són a la vegada regulats per factors activadors i inhibidors del creixement [95, 96].

Diversos factors regulen de manera molt precisa la progressió del cicle cel·lular, de manera que els seus nivells poden considerar-se com a marcadors de l'estat de proliferació/diferenciació de la cèl·lula. Alguns d'aquests gens marcadors s'han estudiat en el present treball; en concret els que es refereixen a continuació:

### c-Jun i c-Fos

L'AP1 (*Activator Protein 1*) és un factor de transcripció dimèric que està format per proteïnes de les famílies Jun, Fos o ATF (*Activating Transcription Factor*), que s'uneix a una seqüència concreta d'ADN (*AP1 response element*) i està implicat en la proliferació, transformació i apoptosi [37]. Les proteïnes AP1, principalment les que pertanyen a la família Jun, són capaces de promoure la proliferació cel·lular per la capacitat que presenten de regular l'expressió de gens que controlen el cicle cel·lular, com per exemple el de la ciclina D1 [86, 87].

### c-Myc

c-Myc és un protooncogèn que codifica per a un factor de transcripció (la proteïna Myc) que promou la progressió del cicle cel·lular i la proliferació a més d'inhibir la diferenciació i sensibilitzar les cèl·lules a l'apoptosi [36]. L'expressió de c-Myc és necessària per a la proliferació. La seva sobreexpressió s'ha associat a varis tipus de càncers humans (de mama, de fetge, de colon i de pulmó), mentre la seva expressió disminuïda s'associa amb diferenciació i amb disminució de la proliferació [98].

### PCNA

El PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) és una proteïna auxiliar de l'ADN polimerasa  $\delta$  de mamífers, que es sintetitza principalment a la fase S i la seva taxa de síntesi es correlaciona directament amb l'estat proliferatiu de cèl·lules normals en cultiu i de teixits. És una proteïna que té un paper central a les rutes que condueixen a la replicació de l'ADN i a la divisió cel·lular [18].

### Ciclina D1

El gen de la ciclina D1 codifica per a la subunitat reguladora d'un holoenzim que fosforila i inactiva la proteïna del retinoblastoma i que promou la progressió de la fase  $G_1$  a la fase S dins el cicle cel·lular. La seva sobreexpressió juga un paper important en el desenvolupament d'una sèrie de càncers a humans. Dels tres tipus de ciclines D, és la sobreexpressió de ciclina D1 la que està més associada a la formació de tumors i a processos de metàstasi [30].

### RAR $\beta$

L'RAR $\beta$  és un membre de la família de receptors nuclears de retinoides que ha estat proposat com a supressor tumoral [51]. Es sap que tumors primaris i línies cel·lulars de càncer de pulmó deixen d'expressar RAR $\beta$  i que la pèrdua d'expressió d'aquest gen pot donar-se des dels estadis primerencs en el desenvolupament de càncer de pulmó [102]. Per tant, podria representar un marcador primerenc de l'estat cancerigen de la cèl·lula [52].

## **1.3 EFECTES DE LA VITAMINA A SOBRE LA DESPESA ENERGÈTICA**

### **1.3.1 L'obesitat i la regulació del pes corporal**

L'obesitat és un desordre multifactorial, al qual contribueixen factors genètics i ambientals, que es manifesta en forma d'acumulació d'un excés de greix als dipòsits de teixit adipós. És el resultat d'una alteració del balanç energètic en què la ingesta calòrica supera la despesa energètica com a resultat d'alteracions genètiques o adquirides en algun o alguns dels principals processos bioquímics que afecten la regulació del pes corporal: a) el control de la ingesta; b) l'eficiència energètica o el grau d'aprofitament d'energia que contenen els nutrients; c) l'adipogènesi o el conjunt d'esdeveniments que condueixen a la formació de cèl·lules especialitzades en emmagatzemar lípids (adipòcits); i/o d) la partició de nutrients entre els teixits [64]. Conèixer de quina manera els nutrients o components dels aliments poden afectar els processos de regulació del pes corporal pot resultar útil per ajudar a controlar el pes corporal, i per tant, les complicacions mèdiques de l'obesitat i malalties associades (revisat a [64, 65]).

### **1.3.2 El teixit adipós**

El teixit adipós comprèn un conjunt de dipòsits de greix que es poden classificar en subcutanis i viscerals o interns en funció de la seva localització anatòmica. En els mamífers, aquests dipòsits de greix estan composts principalment per almenys dos tipus d'adipòcits: blancs i marrons, que difereixen en morfologia i funció (fig. 6). El color del dipòsit depèn del tipus d'adipòcit que preval: si prevalen els adipòcits blancs, el color del dipòsit serà blanc (teixit adipós blanc, TAB), i si prevalen els adipòcits marrons, el color del dipòsit serà més marró (teixit adipós marró, TAM) [19, 20].

El TAB i el TAM tenen funcions oposades en el manteniment del balanç energètic total de l'organisme. Mentre el TAB s'encarrega d'emmagatzemar l'excés d'energia en forma de triglicèrids i de proporcionar energia quan l'organisme en requereix, el TAM s'encarrega de dissipar l'energia que conté en

forma de calor (termogènesi) per mantenir la temperatura corporal (revisat a [63]). En comparació amb el TAB, el TAM està més vascularitzat i més intensament innervat pel sistema nerviós simpàtic, el qual controla el desenvolupament i l'activitat termogènica del TAM [17].

Els adipòcits blancs i marrons tenen en comú la capacitat d'acumular i mobilitzar triglicèrids i d'expressar receptors  $\beta$ -adrenèrgics, però manifesten moltes diferències, el que els defineix com a dos tipus cel·lulars diferents. En comparació amb els adipòcits marrons, els adipòcits blancs són més grans, acumulen més quantitat de triglicèrids dipositats en una gran gota lipídica que ocupa gairebé tot el citoplasma (unilocularitat), presenten pocs mitocondris i una baixa capacitat oxidativa i no expressen proteïna desacobladora 1 (UCP1). En canvi, els adipòcits marrons són més petits, contenen triglicèrids repartits en múltiples gotícules lipídiques (multilocularitat), són rics en mitocondris amb crestes densament empaquetades, tenen un metabolisme oxidatiu intens i expressen de manera característica la UCP1 [19].

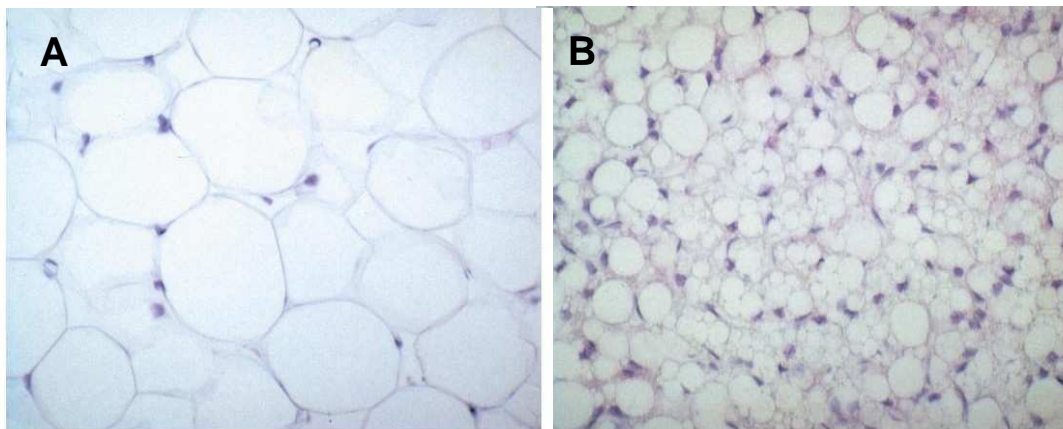


Figura 6. Talls de teixit adipós tenyits amb hematoxilina-eosina.  
A. Teixit adipós blanc; B. Teixit adipós marró

El TAM és abundant als fetus i, probablement, als nadons de tots els mamífers. Rosegadors i hivernants mantenen dipòsits de TAM ben definits en l'edat adulta, però a altres espècies, incloent la humana, sembla que el TAM es va atrofiar després del naixement. Ara bé, recentment, aquesta idea de què el TAM d'adults humans és pràcticament menyspreable ha estat qüestionada arrel de les observacions realitzades per tomografia d'emissió de positrons (*positron*

*emission tomography*, PET) utilitzada en medicina nuclear per detectar metàstasis tumorals. Aquesta tècnica ha permès visualitzar àrees de TAM simètriques a la part superior del cos humà, cosa que reforça la idea de que l'estimulació del TAM pot ser una diana en el tractament de l'obesitat i malalties metabòliques associades no només a rosegadors i petits mamífers, sinó també a humans [59].

### 1.3.3 La proteïna UCP1

La proteïna UCP1 és la principal responsable de la termogènesi al TAM (fig. 7) i s'ha considerat com a marcador molecular dels adipòcits marrons atès que és expressada exclusivament per aquest tipus de cèl·lules (revisat a [53, 63]).

La UCP1 és una proteïna de codificació nuclear que es troba a la membrana mitocondrial interna. Es tracta d'un homodímer format per dues subunitats de 33kDa i 306 aminoàcids cada una.

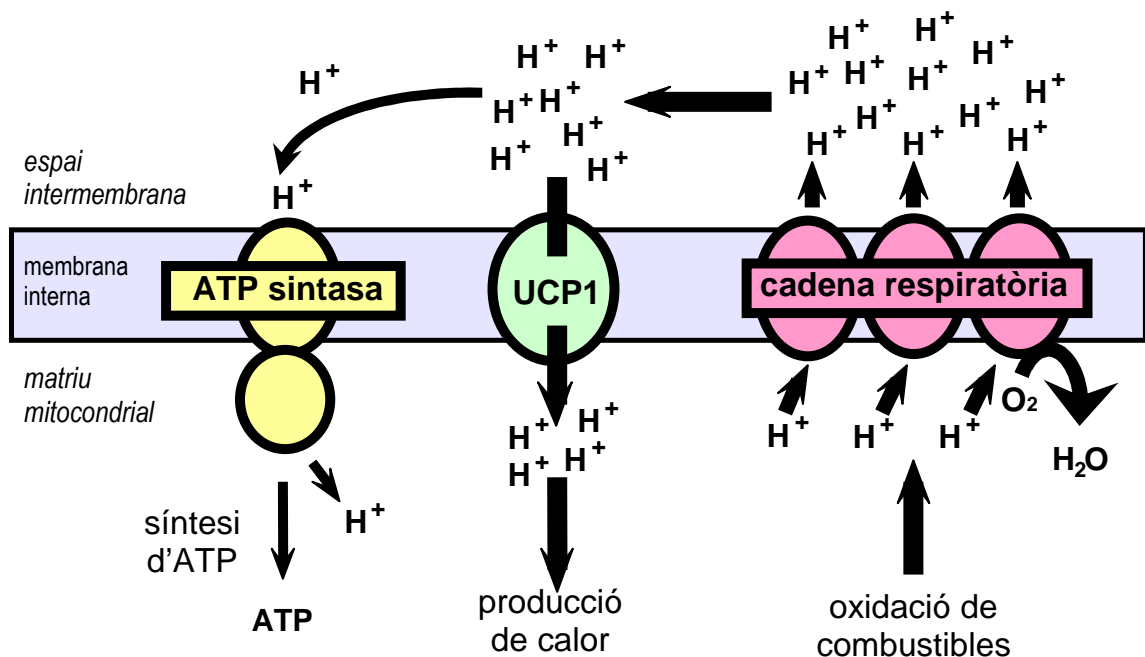


Figura 7. Representació esquemàtica de l'acció desacobladora de la proteïna UCP1. Part del gradient protònic generat a la cadena respiratòria es dissipa a través de la UCP1 (generant calor) en comptes d'emprar-se per a la síntesi d'ATP per l'ATP-sintasa. Adaptat de [63].

Aquesta proteïna funciona com un transportador de protons i és la responsable de la producció regulada de calor mitjançant la dissipació del gradient protònic generat per l'activitat de la cadena respiratòria, desacoblant d'aquesta manera la fosforilació oxidativa (revisat a [63]).

### **1.3.3.1 La termogènesi induïda per la dieta i pel fred**

La funció principal del TAM és escalfar la sang per tal de mantenir l'animal en homeotèrmia davant les diferents condicions fisiològiques en què aquest es pot trobar. Smith (1961) fou el primer en descriure aquesta funció termogènica del TAM, que després s'anomenà termogènesi no tremolosa (*Non-Shivering Thermogenesis*, NST). En aquest sentit, la termogènesi al TAM s'activa durant el període del despertar de la hibernació i també durant l'exposició al fred (*Cold-Induced Thermogenesis*, CIT) revisat a [94]. També hi ha evidència que s'activa quan s'ha produït un excés d'ingesta alimentària, i en aquest cas s'anomena termogènesi induïda per la dieta (*Diet-Induced Thermogenesis*, DIT) [78].

La termogènesi induïda per la dieta és una resposta a una excessiva ingesta calòrica que es tradueix en un augment de la despesa energètica i serveix per prevenir l'organisme d'un augment de pes excessiu i, per tant, pal·liar l'obesitat induïda per la dieta (revisat a [54]).

La capacitat termogènica del TAM és controlada a curt termini modulant l'activitat de la UCP1 i, a més llarg termini, modulant els nivells d'expressió d'UCP1 i el desenvolupament del TAM. El control a tots aquests nivells depèn del sistema nerviós simpàtic [16, 17].

Als centres simpàtics centrals hi arriben senyals que reflecteixen distintes condicions fisiològiques de l'organisme (temperatura, ingesta, estat hormonal, estat dels dipòsits de greix, etc.) com poden ser la leptina, el neuropèptid Y [9], la serotonina (revisat a [15]) i altres. La resposta que aquests senyals generen al sistema nerviós central es tradueix mitjançant la noradrenalina en una acció directa sobre els adipòcits marrons. El control de la termogènesi per vies

adrenèrgiques es realitza principalment a través del receptor adrenèrgic  $\beta_3$ , el qual és abundant a la membrana plasmàtica dels adipòcits marrons. L'activació dels receptors adrenèrgics  $\beta_3$  suposa, per una banda, un augment en els àcids grassos lliures que serveixen com a combustible per a la termogènesi, a la vegada que estimulen directament l'activitat desacoblant de la UCP1; per altra banda, suposa una inducció de l'expressió d'UCP1 a nivell transcripcional (fig.8).

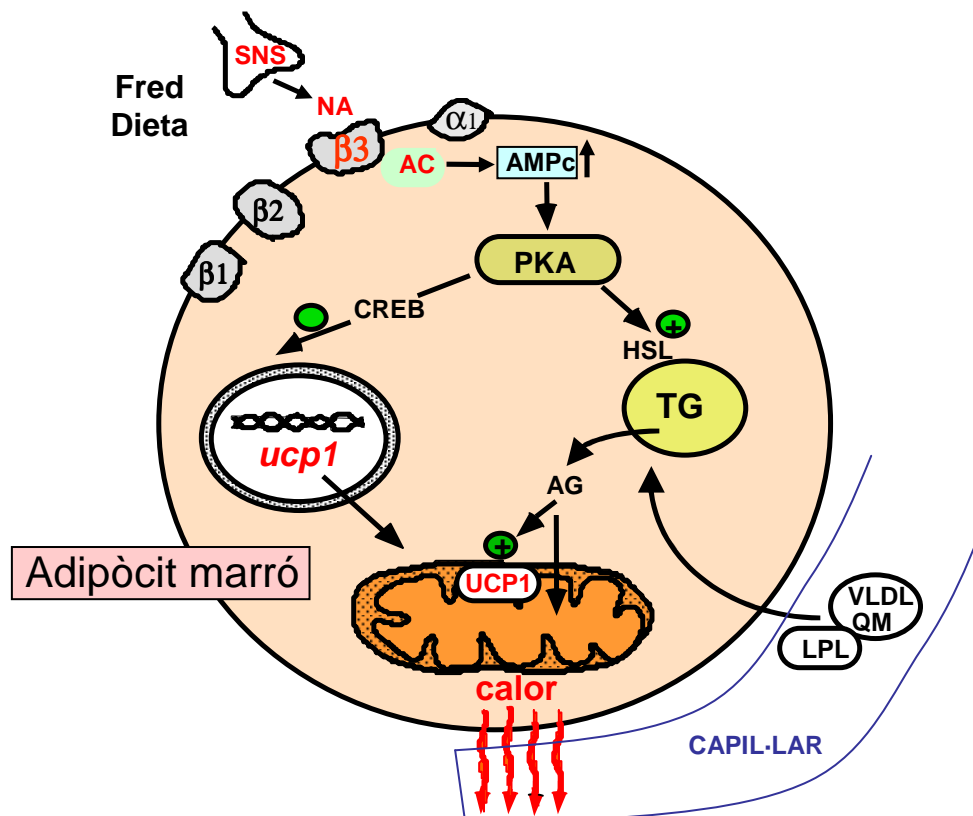


Figura 8. Regulació adrenèrgica del sistema de la UCP1.

Abreviatures: SNS, sistema nerviós simpàtic; NA, noradrenalina;  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ , receptors adrenèrgics  $\beta$ ;  $\alpha_1$ , receptor adrenèrgic  $\alpha_1$ ; AC, adenilat ciclasa, AMPc, AMP cíclic; PKA, proteïna cinasa dependent d'AMPc; CREB, proteïnes d'unió a elements de resposta a AMPc; UCP1, proteïna desacoblant 1; *ucp1*, gen de la UCP1; HSL, lipasa sensible a hormones; TG, triacilglicèrids; AG, àcids grassos; VLDL, lipoproteïnes de molt baixa densitat; QM, quilomicrons; LPL, lipoproteïna lipasa. Adaptat de [85]

A més, a llarg termini, la noradrenalina també estimula la hipertrofia del TAM, activant la proliferació dels adipòcits marrons i la mitocondriogènesi [16, 17].



Contràriament, l'activitat transportadora de protons de la UCP1 es veu inhibida per nucleòtids [72], principalment per la unió d'ATP en condicions fisiològiques a llocs d'unió específics de la UCP1 [43].

### **1.3.3.2 Regulació de la UCP1 per nutrients. Efectes de la vitamina A**

L'expressió d'UCP1 és sensible a diversos factors nutricionals. Així, es sap que aquesta proteïna és estimulada per diversos tipus d'àcids grassos: una dieta rica en àcids grassos poliinsaturats, particularment en els de la família dels omega-3 (PUFA n-3), és efectiva en la inducció de la UCP1 en ratolins [80]; els àcids grassos de cadena mitjana, com els de l'oli de coco, afegits a la dieta estimulen l'expressió d'UCP1 en rates Wistar alimentades *ad libitum* i prevenen la seva repressió en aquelles a les quals es restringeix l'accés al menjar [68]; una dieta rica en àcid oleic, subministrat per exemple com oli d'oliva, estimula l'expressió de l'ARNm de la *ucp1* en rates Wistar sense augmentar el nivell de la proteïna al TAM ni el consum d'oxigen a teixit adipós, encara que sí augmenta el consum d'oxigen total per part de la rata [77].

El coneixement de les regions reguladores del gen de la UCP1 és essencial per identificar els agents o condicions capaços de modular la seva expressió a adipòcits marrons. S'han caracteritzat dues regions reguladores al gen *ucp1*: un promotor proximal i un estimulador (*enhancer*) distal [17, 91]. El promotor proximal conté, entre d'altres elements, un element de resposta a àcid retinoic (RARE) i un element de resposta a PPAR. Al RARE s'hi uneixen heterodímers RAR:RXR i a l'element de resposta a PPAR s'hi uneixen heterodímers PPAR:RXR. Els heterodímers RAR:RXR activen la transcripció dels gens que controlen amb la unió d'AR *tot-trans* o *9-cis* a la subunitat RAR, mentre que l'heterodímer PPAR:RXR, a més del lligand de la subunitat PPAR, necessita també la unió d'AR *9-cis* a la subunitat RXR per a què l'activació sigui màxima [74].

Pel que fa a l'AR, s'ha demostrat que aquest compost és un modulador positiu de l'expressió de la UCP1 amb una potència semblant a la NA a adipòcits marrons en cultiu [4, 69, 89]. També s'ha demostrat la inducció de la UCP1 al

TAM d'animals tractats de forma aguda amb AR [44, 69] i a animals que han rebut dietes suplementades en vitamina A [45]. Alguns carotenoides naturals, entre ells el BC, també estimulen l'expressió de la UCP1 a adipòcits marrons en cultiu, efecte que podria ser conseqüència, al manco en part, a la seva conversió local a AR [84] ara bé, no es coneix si el BC de la dieta pot augmentar la capacitat termogènica *in vivo*.

L'AR podria induir l'expressió de la UCP1, a més d'actuant com a lligand de receptors de retinoides, per vies addicionals. S'ha descrit que l'activació de la MAPK (proteïna cinasa activada per mitogen) p38 és essencial per a la inducció d'UCP1 per AR a adipòcits marrons fetals en cultiu primari [89]. La MAPK p38 fosforila tota una sèrie de substrats, incloent algunes isoformes d'RAR, la modulació dels quals podria tenir un paper en la inducció de la UCP1 per AR [13, 70].

L'AR podria tenir un efecte dual, estimulants l'activitat de la UCP1 (i les proteïnes desacobladores en general) a més de la seva expressió. Així, s'ha demostrat que l'AR estimula el transport protònic a través de la UCP1 a mitocondris del TAM [72] i a través de la UCP1 introduïda per manipulació genètica a mitocondris de llevats [39].

## **1.4 EFECTES DE LA VITAMINA A SOBRE ALTRES MECANISMES IMPLICATS EN EL CONTROL DEL PES CORPORAL**

La vitamina A, a més de tenir efectes sobre la termogènesi, també té efectes sobre altres processos relacionats amb el teixit adipós com són l'adipogènesi, la funció secretora del teixit adipós i l'adipositat corporal.

### **1.4.1 Vitamina A i adipogènesi**

L'adipogènesi és el procés que implica la determinació i la diferenciació d'una cèl·lula precursora a un adipòcit. Durant aquest procés, un gran nombre de gens són regulats d'una manera selectiva, seqüencial i coordinada, cosa que promou canvis substancials de la morfologia cel·lular, la sensibilitat a hormones i les

capacitats metabòliques de la cèl·lula, particularment les que es refereixen a lipogènesi i lipòlisi i, als adipòcits marrons, també pel que fa a la termogènesi [28]. La vitamina A intervé en el procés d'adipogènesi de diferents maneres.

L'AR és reconegut com un potent inhibidor de la diferenciació dels adipòcits [46, 58]. Es sap que l'addició de dosis elevades d'AR a preadipòcits en una etapa primerenca de la diferenciació inhibeix l'acumulació de lípids i l'expressió de marcadors moleculars de diferenciació adipocitaris. A més, dosis elevades d'AR promouen l'apoptosi a preadipòcits de rata en cultiu primari [41] i a preadipòcits 3T3-L1 (una línia cel·lular immortalitzada de fibroblasts de ratolí ja compromesos a diferenciar-se a adipòcits blancs) cultivats amb sèrum delipidat.

Contràriament, dosis baixes d'AR (1-10nM) estimulen l'adipogènesi a preadipòcits en cultiu [81]. A més, el compromís de les cèl·lules mare embrionàries amb la línia adipocitària és depenent de la presència d'AR tot-*trans* al medi [12, 22].

#### **1.4.2 Vitamina A i adipositat corporal**

Hi ha evidència creixent que l'estatus i el metabolisme de la vitamina A impacten sobre l'adipositat corporal. Per exemple, el tractament agut amb AR redueix l'adipositat corporal i l'expressió de factors de transcripció adipogènics/lipogènics (notablement el PPAR $\gamma$ 2) als teixits adiposos de ratolí [27, 73]. A més, la suplementació crònica de la dieta amb vitamina A tendeix a alentir el desenvolupament d'obesitat dietètica a ratolins [26] i redueix l'adipositat a rates de la soca WNIN/Ob obeses [35]. En canvi, una dieta deficient en vitamina A s'associa a un increment més marcat de la massa dels teixits adiposos [73].

L'homeòstasi de la vitamina A afecta l'adipositat, com s'ha demostrat a ratolins deficients en l'enzim retinol deshidrogenasa (Rdh1), el qual catalitza la formació de retinaldehid a partir de retinol (reacció reversible), o en l'enzim retinaldehid deshidrogenasa (Raldh1), el qual catalitza la formació d'AR a partir de retinaldehid (reacció irreversible). Així, els ratolins rdh1 $^{-/-}$  desenvolupen una

major adipositat que els seus controls [101], mentre que els ratolins *raldh*<sup>-/-</sup> són resistents a l'obesitat induïda per la dieta [105]. El desenvolupament d'obesitat als ratolins *rdh1*<sup>-/-</sup> no sembla estar relacionada amb un dèficit d'AR, ja que els nivells d'AR a teixit són normals, la qual cosa s'explica per la inhibició compensatòria de l'expressió del principal enzim implicat en el catabolisme de l'AR quan falta *Rdh1* [101]. D'altra banda, els ratolins *raldh1*<sup>-/-</sup> presenten nivells reduïts d'AR i nivells incrementats de retinaldehid a teixit adipós [105]. En conjunt, aquests resultats són consistents amb un paper important del retinaldehid en el control de les reserves lipídiques, amb independència del seu paper com a precursor d'AR.

També hi ha evidències a humans de que l'estatus en vitamina A pot influir en l'adipositat corporal. S'ha descrit que infants i adolescents amb sobrepès presenten concentracions de carotenoides menors que els normopesos [24]. Així mateix, nivells circulants baixos de retinol i BC s'han associat amb obesitat mòrbida, resistència a la insulina i desenvolupament de fetge greixós a humans [21, 66, 90].

No es coneixen els efectes del BC de la dieta sobre l'adipositat corporal i la despesa energètica. Ara bé, en vista dels efectes descrits de l'AR en el control de la termogènesi i l'adipositat corporal i considerant que la font principal dels retinoides de la dieta al nostre organisme són els carotenoides de la dieta, resulta d'interès determinar en un model animal semblant als humans si el BC té també aquests efectes.

## **2. OBJECTIUS**



L'objectiu general d'aquesta tesi ha estat determinar els efectes del  $\beta$ -carotè (BC) i aspectes mecanístics en relació a la promoció o protecció envers el desenvolupament del càncer de pulmó i sobre l'adipositat corporal i la capacitat termogènica en un model experimental, la fura (*Mustela putorius furo*), amb característiques semblants als humans pel que fa a l'absorció i metabolisme del BC.

El plantejament d'aquest estudi sorgí a la vista dels resultats obtinguts, aparentment contradictoris, en els diferents estudis amb BC, alguns dels quals (observacionals en humans i d'intervenció en rosegadors) el proposaven com a protector i d'altres (d'intervenció en humans) com a promotor del càncer de pulmó.

Per altra banda, i considerant que el BC és el principal precursor de la vitamina A als mamífers, ens vam plantejar determinar si el BC tenia efectes sobre l'adipositat corporal i la capacitat termogènica.

El treball experimental s'ha dut a terme al Laboratori de Biologia Molecular, Nutrició i Biotecnologia – Nutrigenòmica de la Universitat de les Illes Balears, dirigit pel Professor Andreu Palou. S'ha completat la formació en tècniques de biologia molecular amb una estància de 37 setmanes al laboratori del Dr. Jaap Keijer, director del *Food Bioactives Group* al *Rikilt Institute, Wageningen University* (Països Baixos). A més, alguns dels estudis s'han dut a terme en col·laboració amb els laboratoris de Roche *DMS Nutritional Products Ltd.* de Basel (Suïssa) i amb el grup que dirigeix el Professor Saverio Cinti a l'*Istituto di Morfologia Umana Normale* de la Universitat d'Ancona (Itàlia) en el marc del projecte europeu *Dietary lipids as risk factors in development; mechanistic issues* (DLARFID (QLRT-2001-00183))

A la tesi s'han plantejat més concretament els objectius següents:

**Objectiu a)** Determinar l'efecte de l'administració per via oral, diàriament i durant sis mesos, de dues dosis diferents de  $\beta$ -carotè (BC) (administrat en una

formulació soluble en aigua que contenia també  $\alpha$ -tocoferol i palmitat d'ascorbil) en combinació o no amb el benzo[a]pirè (BP), sobre marcadors tumorals i la morfologia dels pulmons a la fura. Els resultats d'aquests estudis van ser objecte de la publicació corresponent al **manuscrit 1**.

**Objectiu b)** Determinar els efectes de la suplementació amb dues dosis de BC sobre l'adipositat i morfologia del teixit adipós de la fura. Els resultats d'aquests estudis van conduir a la publicació del **manuscrit 2**.

**Objectiu c)** Caracteritzar l'expressió de l'UCP1 en els distints dipòsits de teixit adipós a la fura i estudiar la seva estimulació en resposta al fred. Els resultats d'aquests estudis es troben recollits al **manuscrit 3**.

**Objectiu d)** Estudiar els efectes de la suplementació de les fures amb dues dosis de BC sobre la capacitat termogènica dels distints dipòsits de teixit adipós i determinar si els efectes poden estar mediat per l'AR. Els resultats d'aquests estudis es troben recollits al **manuscrit 4**.



### **3. DISSENYYS EXPERIMENTALS**



Tots els models experimentals emprats per a desenvolupar aquesta tesi han estat models *in vivo*, utilitzant la fura (*Mustela putorius furo*) com a animal d'experimentació.

Els detalls de cada tècnica emprada es troben exposats als manuscrits corresponents i a l'Annex I.

1) *Tractament crònic amb BC i BP*. S'empraren 30 fures femella de 7 setmanes d'edat, estabulades a 22°C, amb cicles de llum de 12h, alimentades amb pinso per a moixos i amb lliure accés al menjar i a l'aigua durant tot el temps d'estabulació. Després d'una primera setmana d'aclimatació, es dividiren els animals en 5 grups: *i*) control; *ii*) BC 0,8mg/kg animal i dia; *iii*) BC 3,2mg/kg animal i dia; *iv*) BP; *v*) BP + BC 0,8mg/kg animal i dia.

En aquest moment començà el tractament amb BC que durà 6 mesos. El BC era administrat als animals dels grups *ii*, *iii* i *v*, en una formulació soluble en aigua (*beadlets*) subministrada per *DMS Nutritional Products Ltd.* de Basel (Suïssa) que, a més de contenir el 10% de BC, contenia també com a estabilitzants  $\alpha$ -tocoferol i palmitat d'ascorbil. Els animals dels grups *i* i *iv* rebien la mateixa formulació soluble en aigua sense contenir BC. La freqüència del tractament amb BC va ser d'una dosi diària.

Una setmana després, començà el tractament amb BP que es va dur a terme durant 10 setmanes. Durant aquest temps, els animals dels grups *iv* i *v* rebieren BP dissolt en oli d'oliva fins a un total de 240mg/kg animal. La freqüència de les dosis de BP era de 3 per setmana. Durant aquest període, la resta de grups rebien oli d'oliva (el vehicle del BP).

Ambdós tractaments es van fer per via oral.

A tots els animals es va estudiar l'efecte dels dos tractaments (amb BC i amb BP) sobre: a) els nivells de BC i apocarotenals assolits a plasma i a pulmó al final dels tractaments; b) l'expressió d'ARNm específics i nivells de proteïna de RAR $\beta$ , c-jun, c-fos, c-myc, PCNA i ciclina D1; i c) la morfologia del pulmó.

A més, als animals dels grups *i*, *ii* i *iii* es va determinar l'efecte del tractament amb BC sobre: a) el pes corporal; b) el pes dels dipòsits adiposos inguinal, retroperitoneal, mesentèric, gonadal i parametrial; c) la morfologia del fetge, estómac, duodè i colon; d) la vasculogènesi del dipòsit inguinal; e) la morfologia i morfometria dels dipòsits de teixit adipós interescapular, inguinal i retroperitoneal; f) els nivells d'UCP1 d'aquests tres dipòsits; i g) la localització de l'UCP1 per immunohistoquímica en el dipòsit retroperitoneal.

2) *Tractament agut amb AR*. S'empraren fures de 10 mesos d'edat, que havien estat estabulades des dels 2 mesos a 22°C, amb cicles de llum de 12h, alimentades amb pinso per a moixos i amb lliure accés tant al menjar com a l'aigua durant tot el temps d'estabulació. Aquests animals es van tractar amb una dosi oral diària d'AR tot-*trans* (0,25 o 25mg/kg animal i dia) durant els 7 dies previs al sacrifici. L'AR es va administrar a partir d'una suspensió de 0,40mg AR/ml o de 40mg AR/ml dissolt en oli d'oliva segons es tractàs del grup que rebia 0,25 o 25mg AR/kg animal i dia. A cada animal se li administrava el volum necessari depenent de la dosi que havia de rebre i del seu pes en el moment del tractament. Als animals del grup control, se'ls administrava el vehicle (oli d'oliva).

Es va determinar l'efecte del tractament sobre: a) el pes corporal; b) el pes dels dipòsits adiposos interescapular, inguinal, retroperitoneal, gonadal i mesentèric; c) la morfologia i morfometria dels dipòsits de teixit adipós interescapular, inguinal i retroperitoneal; d) els nivells d'UCP1 d'aquests tres dipòsits; i e) la localització de l'UCP1 per immunohistoquímica en el dipòsit retroperitoneal.

3) *Exposició al fred*. S'empraren fures de 10 mesos d'edat, que havien estat estabulades des dels 2 mesos d'edat a 22°C, amb cicles de llum de 12h, les quals havien estat alimentades amb pinso per a moixos i aigua, havent tengut lliure accés tant al pinso com a l'aigua. En la setmana anterior al sacrifici, la meitat de les fures seguiren estabulades exactament en les mateixes condicions, mentre que l'altra meitat va ser estabulada en les mateixes condicions a excepció de la temperatura, que va ser de 4°C durant aquesta darrera setmana.

Es va determinar l'efecte de la temperatura sobre: a) el pes corporal i l'adipositat corporal; b) la morfologia i morfometria dels dipòsits interescapular i retroperitoneal; c) la quantitat de proteïna total i mitocondrial als dipòsits adiposos interescapular, inguinal i retroperitoneal d) l'activitat de la citocrom c oxidasa (COX) als tres mateixos dipòsits adiposos; e) els nivells de proteïna UCP1 als dipòsits adiposos interescapular i retroperitoneal; i f) la seva localització per immunohistoquímica.





**4.RESULTATS I DISCUSSIÓ  
(MANUSCRITS)**







Manuscript I

***Effects of 6-month daily supplementation with oral beta-carotene in combination or not with benzo[a]pyrene on cell cycle markers in the lung of ferrets***

Fuster MA, Picó C, Sánchez J, Oliver P, Zingaretti MC, Murano I, Morroni M, Hoeller U, Goralczyk R, Cinti S, Palou A

Journal of Nutritional Biochemistry. 19:295-304 (2008)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17651958>



Manuscrit II

***Morphology of ferret subcutaneous adipose tissue after 6-month daily  
supplementation with oral beta-carotene***

Murano I, Morroni M, Zingaretti MC, Oliver P, Sánchez J, Fuster MA, Picó C,  
Palou A, Cinti S

Biochimica et Biophysica Acta 1740:305-312 (2005)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15893457>



Manuscrit III

***UCP1 and oxidative capacity of adipose tissue in adult ferrets (*Mustela putorius furo*)***

Fuster MA, Oliver P, Sánchez J, Picó C, Palou A  
Biochemistry and Physiology. Part A. En premsa (2009)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19535042>









Manuscrit IV

***Opposite effects of beta-carotene and retinoic acid supplementation on  
adipose tissue thermogenic capacity in ferrets***

Sánchez J\*, Fuster MA\*, Oliver P, Picó C, Palou A

En vies de publicació

Opposite effects of beta-carotene and retinoic acid supplementation on adipose tissue thermogenic capacity in ferrets

Juana Sánchez\*, Antonia Fuster\*, Paula Oliver, Catalina Picó and Andreu Palou

Laboratory of Molecular Biology, Nutrition and Biotechnology, Universitat de les Illes Balears, and CIBER de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN), Palma de Mallorca, Spain.

**\* Sánchez and Fuster contributed equally to this work**

Corresponding author: Andreu Palou. Universidad de las Islas Baleares. Edificio Mateu Orfila. Cra. Valldemossa Km 7.5. Palma de Mallorca 07122. Spain. Tel: +34 971173170; Fax: +34 971173426; e-mail: [andreu.palou@uib.es](mailto:andreu.palou@uib.es)

**Running title:** beta-carotene and thermogenesis in ferrets

**Key words:** carotenoids, uncoupling protein, adiposity, body weight.

## Abstract

Retinoic acid (RA) treatment and vitamin A status influences body adiposity in rodents, with a low status favoring increased fat deposition and reduced expression of uncoupling protein-1 (UCP1) in brown adipose tissue. However, we previously described that the intake of pharmacological doses of beta-carotene (BC) (the main provitamin A carotenoid in mammals) resulted in higher body weight gain in the ferret, an animal model that resembles humans in terms of intestinal BC absorption and metabolism. Thus, the aim of this study was to characterize in this animal model whether the mentioned changes in body weight could be explained by changes in adipose tissue thermogenic capacity. We studied the effects of 6-month supplementation with BC (0.8 and 3.2 mg/kg/day) on adipose tissue morphology and UCP1 expression. BC supplementation resulted in higher body weight (the high-dose), induced depot- and dose-dependent hypertrophy of white adipocytes, decreased the amount of brown-like multilocular adipocytes in the retroperitoneal depot, and decreased UCP1 content in different fat depots. To ascertain whether BC effects could be mediated by RA, 1 week supplementation with RA (0.25 and 25 mg/kg/day) was also studied. Unlike BC, RA treatment resulted in a slight decrease in adiposity, decreased cell lipid accumulation and increased UCP1 content. In conclusion, RA, but not BC, may have in the ferret comparable effects to those described in rodents, whereas differences concerning BC and RA treatments may be attributable to the different BC metabolism in this animal model with a lower conversion of BC to RA compared to rodents.

## Introduction

The world wide increase in obesity prevalence and its associated medical complications have awoken great interest in the identification of the main factors involved in body weight control and in the identification of strategies for its prevention and treatment <sup>(1,2)</sup>. Knowledge of nutrients or food components able to influence energy balance, by altering energy expenditure, as well as through effects on the biology of adipose tissue, are potentially useful in designing functional foods or diets to help body weight control.

Among nutrients known to influence energy balance is vitamin A, which is a nutrient that has many remarkable effects on adipose tissue biology and energy metabolism (reviewed in <sup>(3)</sup>). Retinoic acid (RA), its carboxylic form, promotes <sup>(4)</sup> or inhibits <sup>(5)</sup> adipogenesis of preadipose cells in culture depending on the dose, and increases thermogenic capacity by inducing the expression of uncoupling protein 1 (UCP1) in cultured brown adipocytes <sup>(6,7)</sup> and in brown adipose tissue of rodents <sup>(7)</sup>. Moreover, both RA treatment and vitamin A status influences body adiposity in rodents, with a low status favoring reduced expression of UCPs and increased fat deposition <sup>(8,9)</sup>.

Beta-carotene (BC) is one of the main provitamin A carotenoids in mammals, which has special interest by itself, as well as a vitamin A precursor. All retinoids in the body originate from the diet, which supplies both esters of retinol with fatty acids and mainly carotenoids that behave as vitamin A precursors <sup>(10)</sup>. Similar effects to that of RA on UCP1 induction have been described for BC and several other carotenoids with pro-vitamin A activity, such as alpha-carotene and lutein, in primary cultures of mice brown adipocytes, with an effectiveness that is related

to their potency as vitamin A precursors <sup>(11)</sup>. BC also has features of a UCP1 activator, since its addition to cells increases the basal oxygen consumption of brown adipocytes (as does retinoic acid), which can be explained by a successive accumulation in the brown fat cells of retinoic acid obtained from BC cleavage <sup>(12)</sup>. However, whether dietary BC increases 'in vivo' thermogenic capacity is not known.

BC from the diet accumulates in adipose tissues and can be converted intracellularly to retinoids, including RA, which are also stored in adipose tissues <sup>(3)</sup>. Nevertheless, intestinal BC absorption as well as diet carotenoid conversion into retinoids is strictly species-specific <sup>(13)</sup>. Rodents are extremely efficient converters and therefore do not absorb intact BC and do not accumulate appreciable tissue beta-carotene, whereas humans absorb significant amounts of uncleaved carotenoids and accumulate them in peripheral tissues, notably adipose tissues, where carotenoids may be metabolized to retinol and RA <sup>(13-15)</sup>. In this sense, the ferret (*Mustela putorius furo*) offers an excellent animal model to use in mimicking the conditions of humans, because these animals, like humans, absorb dietary BC intact and accumulate it in tissues and serum in a dose-response manner <sup>(16-19)</sup>. In addition, tissue distribution of carotenoids in ferrets is similar to that of humans <sup>(14,17,20)</sup>. Therefore use of the ferret as a model for studying human carotenoid effects seems well justified <sup>(16,18,21)</sup>.

Interestingly, and unlike the aforementioned effects described in rodents using RA, we previously described in ferrets that the intake of pharmacological doses of BC for 6 months resulted in a higher body weight gain compared with controls <sup>(22)</sup>, although whether this effect could be explained by changes in the thermogenic capacity was not known. Thus, the aim of the current study was to characterize in

ferrets the effects of chronic supplementation with two different doses of BC on thermogenic features (UCP1 expression and morphology) of different adipose tissue depots. To ascertain whether the effects could be mediated by RA, the acute effects of supplementation with two different doses of RA were also studied in this animal model.

## Experimental methods

### *1. Animals and treatments*

#### *Experiment 1. Effects of chronic supplementation with two different doses of beta-carotene*

18, 2-month-old, female ferrets (Exopet AB, Glommen, Sweden) were housed at 22°C with a 12h light/dark cycle (lights on at 08:00) and free access to food and water. The gross composition of the chow diet (Friskies, Spain) used was the following: 32% protein, 34.4% carbohydrate, 10% fat, 3% fibre, 9.5% moisture, 3.6% minerals and 7.5% as residue of total mass.

After 1 week adaptation, the animals were randomized to three experimental groups with six animals in each: control, BC 0.8 and BC 3.2. The animals in the BC 0.8 and BC 3.2 groups received a daily oral BC supplementation for six months with doses of 0.8 mg beta-carotene/kg body weight/day and 3.2 mg beta-carotene/kg body weight/day, respectively. BC was provided by DMS Nutritional Products Ltd. (Basel, Switzerland) as a water soluble formulation (beadlets) containing beta-carotene crystalline, DL-alpha-tocopherol, ascorbyl palmitate, as well as carriers such as corn oil, fish gelatine, sucrose and corn starch <sup>(23)</sup>. This formulation was given orally dissolved in 200 µl of



water. The animals in the control group received the same formulation without BC, also provided by the manufacturer, exactly in the same way as the animals in the BC groups.

### ***Experiment 2. Effects of acute supplementation with two different doses of retinoic acid***

18, 10-month-old, female ferrets, from the same supplier and housed in the same conditions as described in experiment 1, were randomized to three experimental groups: control, RA 0.25 and RA 25 (6 animals per group). The animals in the RA 0.25 and RA 25 groups received oral RA supplementation for 7 days with doses of 0.25 mg retinoic acid/kg body weight/day and 25 mg retinoic acid/kg body weight/day respect<sup>73</sup>

Retinoic acid was provided by (Sigma, Madrid, Spain), and was given to animals dissolved in a volume of 500 µl of olive oil (Carbonell, Spain). The animals in the control group received the same amount of olive oil without RA.

### ***2. Sample collection***

At the end of the treatments, ferrets from both experiments were anesthetized using 10 mg/Kg ketamine hydrochloride (Imalgène 1000, Merial Laboratorios SA, Lyon, France) and 80 µg/Kg medetomidine (Domtor, Orion Pharma, Espoo, Finland). Arterial blood was collected from the left ventricle in heparinized tubes and animals died by exsanguination. Afterwards different adipose depots were rapidly removed and weighed. Samples for Western blot analysis were frozen in liquid nitrogen and stored at -70°C until determinations were carried out. Samples for light microscopy analysis techniques were immediately fixed as described below.

### ***3. Total lipid content extraction and quantification***

Lipid extraction was performed as previously described <sup>(24,25)</sup>, with some modifications. Briefly, retroperitoneal, inguinal, and interscapular and adipose tissue samples were mixed with 1 mL of hexane:isopropanol (3:2, v/v). The tubes with the samples were gassed with nitrogen before being closed to minimize lipid oxidation and then left overnight under orbital agitation at room temperature protected from light. The content of each tube was transferred into a new one and 0.3 mL of Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.47 M) was added. Tubes were mixed for 5 min, left for 15 min in orbital agitation, and centrifuged at 1000 g for 10 min at 4°C. The upper phase containing lipids was dissolved in hexane and transferred to a clean, previously weighed glass tube. Hexane extract was then dried with nitrogen gas. Once the tube was dried, the percentage of lipids was determined as weight difference between tubes with lipid extract and clean tubes, taking into account the initial amount of tissue present.

#### ***4. Quantification of DNA levels***

For quantification of DNA levels, adipose tissue was homogenized in PBS (phosphate-buffered saline: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl and 10 mM phosphate buffer, pH 7.4) (dilution 1:3, w:v) using a polytron homogenizer, and was then centrifuged at 500 g for 10 min; the supernatant was collected and used for DNA quantification by a fluorometric method that uses 3,5-diaminobenzoic acid <sup>(26)</sup>.

#### ***5. Western blot analysis of UCP1***

UCP1 was determined by western blot in the retroperitoneal, inguinal and interscapular adipose depots of ferrets from each group as previously described <sup>(27)</sup> with slight modifications. The tissues were homogenized at 4°C in 1:5 (w:v) of PBS using a polytron homogenizer. The homogenate was centrifuged at 7000 g and 4°C for 2 min and the supernatant used for UCP1 analysis. Total protein content in these samples was

measured by Bradford's method <sup>(28)</sup>. Western blot was developed using Laemmli method <sup>(29)</sup>. Briefly, 80 µg of proteins were fractioned into a 10% SDS-PAGE and then transferred onto a 0.45 µm nitrocellulose membrane (BioRad, Madrid, Spain). Amidoblack staining was carried out to check equal loading/transfer of the proteins before blocking. The primary antibody solution used was a 1:1000 dilution in PBS-T from an antiUCP1 antibody (alpha-Diagnostic, San Antonio, TX). The secondary antibody was antirabbit IgG antibody conjugated to a streptavidin biotinylated horseradish peroxidase complex (Amersham Biosciences, Barcelona, Spain), diluted 1:5000. The immunocomplexes were revealed using an enhanced chemiluminiscence detection system (ECL) (Amersham Biosciences) exposing the membrane to a Hyperfilm ECL (Amersham Biosciences). The films were scanned by Chemigenius BioImaging System (Syngene, UK), and the bands quantified using the GeneTools Software (Syngene, UK). Brown adipose tissue from rat was used as positive control.

The primary antibody used was designed for rodents, but has been previously checked to be effective for UCP1 analysis in ferrets <sup>(30)</sup>.

## ***6. Light microscopy techniques***

Samples from several adipose depots from these animals were fixed overnight in 4% paraformaldehyde in PB (0.1 M phosphate buffer, pH 7.4), washed in PB and then dehydrated in a series of alcohols (ethanol 75°, ethanol 95°, absolute ethanol and xylene) and paraffine-embedded.

### ***6.1. Immunohistochemistry analysis of UCP1***

After being paraffine-embedded, the retroperitoneal adipose tissue from control animals and those treated with BC and RA were cut in 5 µm thick sections and immunostained

by means of the avidin-biotin technique. These sections were incubated with primary anti-UCP1 antibody (GeneTex, Inc.) diluted 1:150 in PBS and with the corresponding biotinylated anti-rabbit IgG secondary antibody (Vector Laboratories, Burlingame, CA) diluted 1:200. Finally samples were incubated with ABC complex (Vectastain ABC kit, Vector) and peroxidase activity revealed by 3,3'-diaminobenzidine hydrochloride as a chromogen (Sigma, Sant Louis, MO) in water. Sections were counterstained with haematoxylin and mounted in Eukitt (Kindler, Germany).

The primary antibody used cross-reacts with mouse, rat and human UCP1 and has been previously checked to be also effective for ferret samples <sup>(30)</sup>. Mouse interscapular brown adipose tissue sections were used as positive control while negative control was determined by primary antibody omission.

## ***6.2. Morphological analysis of adipose tissue***

Five-micrometer sections of retroperitoneal, inguinal and interscapular adipose tissues were stained with hematoxylin and eosin to assess morphology. Images from light microscopy were digitalized and the area of 100 unilocular cells of each section was determined using Axio Vision software (Carl Zeiss Imaging Solutions). Percentage of multilocularity was also determined in retroperitoneal depot. Multilocular cells were considered with independence of their UCP1 expression.

## ***7. Statistical analysis***

All data are expressed as the mean  $\pm$  SEM. The statistical significance of differences as effect of BC or RA treatment and the effect of the treatments and tissue were assessed by one-way and two-way ANOVA, respectively, followed by a least significant difference (LSD) *post hoc* comparisons. The analyses were performed with SPSS<sup>®</sup> for

windows (SPSS, Chicago, IL). Threshold of significance was defined at  $p < 0.05$  and is indicated when different.

## Results

Experiment 1. Effects of chronic supplementation with two different doses of beta-carotene

### *Effects of BC on body weight and fat depots*

As previously described in the same cohort of animals <sup>(22)</sup>, body weight of ferrets receiving the high-dose of BC was, at the end of the treatment, significantly higher (14%) than controls, while the low-dose did not result in significant changes (Table 1). Moreover, the size of the subcutaneous inguinal depot in animals treated with the high dose of BC was significantly higher ( $p < 0.05$ ) than that of animals treated with the low dose and slightly higher than that of controls (19% and 16% higher, respectively) <sup>(22)</sup>. In addition, other depots, particularly gonadal and retroperitoneal fat depots, were also slightly higher in animals treated with the high dose of beta-carotene compared with controls (Table 1). Food intake, measured on different days during the experimental period, was not different between the groups (data not shown).

### *Effects of BC on morphological and morphometric features of different fat depots*

To approach morphological changes in adipose tissue as effect of BC, the retroperitoneal and inguinal adipose tissue depots were chosen as representative of internal and subcutaneous depots, respectively, and the interscapular depot was also

selected because its location resembles the interscapular brown adipose tissue in rodents.

Adipose tissue morphology was different depending on the anatomical localization. The retroperitoneal depot of control ferrets – unlike this anatomical depot in rodents (which is almost exclusively unilocular<sup>(31)</sup> – consisted of both unilocular and multilocular like adipocytes (Figure 1A), the multilocular cells representing a relative area of 8.62% (Figure 1B). The inguinal and interscapular depots consisted mostly of unilocular adipocytes (Figures not shown).

In the retroperitoneal depot, the percentage of multilocularity decreased significantly with both doses of BC (Figure 1B). In addition, although the total lipid concentration in this tissue was not significantly affected by BC treatment, the DNA content per g wet weight decreased significantly as an effect of both doses of BC, and this resulted in a significant increase in the ratio between both parameters (Table 2). In this way, the mean area of the white adipose unilocular cells in this depot, determined in representative sections, also tended to increase with both doses of BC (27% with BC 0.8 and 39% with BC 3.2) compared with controls, although differences were not statistically significant.

Concerning the inguinal and interscapular depots, BC treatment did not significantly affect the total lipid concentrations in these tissues, but DNA concentration and the lipid/DNA ratio in the inguinal depot of animals treated with the low dose of BC was significantly different (lower and higher, respectively) to that of animals treated with the high dose ( $p < 0.05$  one-way ANOVA) (Table 2). No significant changes were found in the mean area of the white adipose unilocular cells in these depots, although, similarly

to what was observed in the retroperitoneal depot, there was a tendency to increase with BC treatment in a dose-dependent manner, particularly in the interscapular depot.

*Effects of BC on UCP1 in different adipose tissue depots*

**UCP1 analysis by western blot revealed that this protein was present in the three adipose depots analysed, interscapular, inguinal and retroperitoneal (Figure 1C). In control animals, retroperitoneal showed maximum levels of UCP1 compared with the inguinal and the interscapular adipose tissue depots. In this tissue, positive UCP1 staining by immunohistochemistry was found, mainly in multilocular cells (Figure 1A).**

Specific UCP1 levels (per mg of total protein) were affected by BC treatment (Figure 1C). BC treatment resulted in a significant decrease in UCP1 in the three depots studied; this decrease was already significant with the low dose of BC in the retroperitoneal and inguinal depot and with the high dose in the interscapular depot.

79

Experiment 2. Effects of acute supplementation with two different doses of retinoic acid

*Effects of RA on body weight and fat depots*

Body weight was not significantly affected by 7-days RA treatment (Table 3). Neither were any significant changes found in the size of adipose tissue depots as an effect of RA treatment; however, a slight tendency to lower size was also found in the different depots with the low dose of RA compared with controls.

*Effects of RA on morphological and morphometric features of different fat depots*

RA treatment with the low dose resulted in changes in the retroperitoneal adipose tissue morphology, which showed a significant increase in multilocular cells (Figure 2A and

2B). Total lipid concentration and DNA content per g wet tissue were not significantly affected by the RA treatment in any of the depots studied, although the resulting lipid/DNA ratio decreased in the interscapular depots with both doses of RA (Table 4). The treatment with the low dose of RA also resulted in a significant decrease in the mean area of the white adipose unilocular cells in the inguinal depot.

#### *Effects of RA on UCP1 in different adipose tissue depots*

UCP1 was also studied in the retroperitoneal, inguinal and interscapular adipose tissue depots of animals treated with RA. RA treatment with the low dose, but not with the high dose, resulted in a significant increase in UCP1 in the retroperitoneal depot, while no changes were found in the other depots studied (Figure 2C; see also UCP1 immunostaining in the retroperitoneal depot in Figure 2A).

80

## **Discussion**

The present study shows that BC supplementation of ferrets, contrary to what happens with RA, results in higher adiposity and body weight gain, depending on the dose, an effect that is associated to a decrease in the thermogenic capacity of adipose tissues, particularly the retroperitoneal depot, which as previously described <sup>(30)</sup> is the one with the highest thermogenic capacity in this animal model.

**The recent description <sup>(32)</sup> that adult humans have well defined brown adipose tissue depots that can be physiologically stimulated has revived the interest in this adipose tissue and its exclusive uncoupling protein UCP1, as well as in factors, including nutrients or food components, able to induce or to activate UCP1. Vitamin A and its main dietary precursor, BC, have received particular attention**



as nutrients able to stimulate thermogenesis <sup>(3)</sup>. The effects of vitamin A affecting the development and function of white adipose tissue and influencing the activity of brown adipose tissue have been described in several *in vitro* and *in vivo* animal models, particularly rodents <sup>(7,8,33)</sup>. Similar effects to those of RA have been described for BC and other carotenoids with pro-vitamin A activity on UCP1 induction <sup>(11)</sup> and on oxygen consumption <sup>(12)</sup> in cultured brown adipocytes, and its effects have been associated to its cleavage and transformation to retinoic acid. While rodents do not readily absorb intact BC, ferrets mimic the intestinal absorption of BC in humans as they absorb intact BC to a significant extent <sup>(16-18)</sup>. Thus, by considering that carotenoids, particularly BC, are the main source of vitamin A in the body <sup>(10)</sup>, to analyze whether dietary BC, by itself or as a vitamin A precursor, may increase *in vivo* thermogenic capacity becomes interesting in an animal model that resembles humans in terms of BC absorption and metabolism.

Our previous results concerning the effects of BC on body weight and adiposity <sup>(22)</sup> were in some way unexpected considering the condition of BC as a vitamin A precursor and the previous data in rodents showing these compounds as thermogenic activators. In ferrets BC treatment resulted in an increase in body weight and adiposity, depending on the dose, and here we show that this was associated to depot-specific changes in adipose tissue morphology. In particular, these changes involved adipocyte hypertrophy, evidenced by an increase in the lipid to DNA ratio in adipose tissue (particularly in the retroperitoneal depot) and by a tendency to an increase in the size of unilocular cells in different fat depots. In addition, and particularly in the retroperitoneal tissue – which has a considerable amount of brown adipocyte-like multilocular cells – BC treatment resulted in a significant decrease in the amount of these multilocular cells. These changes in adipose tissue morphology were also associated to a decrease in UCP1

content, which was more marked in the retroperitoneal depot, but was also present in the other depots studied, the inguinal and the interscapular ones. All these changes reflect decreased thermogenic features, contrary to what is seen in rodents, and may be explained by a lower conversion of BC to RA, at least not converted in the amounts needed to induce UCP1.

Another explanation could lie in the possibility that RA could have different effects in this animal model, compared with those observed in rodents. However this can be ruled out based on the results achieved in the second experiment performed. We analyzed in another group of ferrets the effects of 7 day supplementation with two doses of RA. Results showed that RA treatment, particularly with the low dose used, resulted in a slight decrease in the size of the different fat depots. RA also resulted in a decrease in lipid accumulation, evidenced by a decrease in the lipid to DNA ratio (in the interscapular depot and with both doses) and in the size of adipocyte cells (in the inguinal depot and with the low dose). Interestingly, the low dose of RA resulted in a significant increase in UCP1 content in the retroperitoneal depot, while no effects were found in the other depots studied. All in all, these results evidence that RA may have in the ferret comparable effects to those described in rodents<sup>(7,8,33)</sup>. Therefore, differences concerning BC and RA treatments may be attributable to the different BC metabolism in this animal model compared to rodents, particularly to the low conversion of BC to RA.

In this sense, in a previous study in the same cohort of animals, we showed that BC supplementation resulted in a dose-dependent increase in plasma BC levels (C:  $5.0 \pm 3.0$  nM; BC 0.8:  $36 \pm 12$  nM; BC 3.2:  $102 \pm 18$  nM)<sup>(23)</sup>; however RA levels in plasma were generally undetectable or under the limit of quantification (0.6 nM and 1.7 nM, respectively), and only low amounts of RA were quantified in the adipose tissue of

some of the animals treated with the high dose of BC (mean value was  $6.7 \pm 3.6$  mmol/Kg). Other authors have also described that dietary BC supplementation of ferrets may also increase circulating BC concentrations to levels similar to those detected in human serum, and also resulted in increased levels in the liver, adipose tissue and other tissues <sup>(17-20,34)</sup>. This is different to what has been reported in rodents, which have low serum carotenoid levels (about 1/1000 of human levels) which are not related to dietary intake <sup>(16)</sup>. In humans, the intake of higher amount of fruits and vegetables has also been found to be associated with higher BC plasma levels, while no significant changes in plasma retinoid (retinol, retinyl esters, and retinoic acid) concentrations have been found <sup>(35)</sup>; this means that there may be little tissue metabolism of BC to retinoids. However, even considering that BC cleavage to RA occurs in small amounts, why BC has opposite effects to that of RA, increasing adiposity and decreasing UCP1 content in the adipose tissue is not known and deserves further investigation.

All in all, these results show that chronic supplementation with BC of ferrets, an animal model that mimics human BC absorption, may result in increased adiposity and lower adipose tissue thermogenic capacity. These effects were opposite to those induced by RA and the results confirmed that the effects of BC stimulating the thermogenic capacity in primary cultures of mice brown adipocytes are likely to be dependent on their cleavage to RA, as previously proposed <sup>(11,12)</sup>. These findings in the ferret (which are more likely to be extrapolated to humans than the results from rodents) may have important implications as to the consideration of BC-rich foods as potential thermogenic regulators and their usefulness in helping control body fat accumulation.

**Acknowledgements:** We thank Enzo Ceresi for technical assistance in immunohistochemistry analysis of UCP1 and in morphometric analysis. This work was

supported by the Spanish Government (Ministerio de Educación y Ciencia, AGL2006-04887/ALI). Our laboratory is a member of the European Research Network of Excellence NuGO (The European Nutrigenomics Organization, EU Contract: FOOD-CT-2004-506360 NUGO). CIBER de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición is an initiative of the ISCIII. The authors have no conflict of interest.

J.S. and A.F. have equally contributed performing the experimental work; P.O. has also contributed to the experimental work, as well as to the study design and analysis and interpretation of data; C.P. has contributed to the study design, analysis and interpretation of data, and has written the article; A.P. has chaired the study and reviewed the final version of the manuscript.

## References

1. Flier JS (2004) Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell* 116, 337-350.
2. Zimmet P, Alberti KG & Shaw J (2001) Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 414, 782-787.
3. Bonet ML, Ribot J, Felipe E *et al.* (2003) Vitamin A and the regulation of fat reserves. *Cell Mol Life Sci* 60, 1311-1321.
4. Safonova I, Darimont C, Amri EZ *et al.* (1994) Retinoids are positive effectors of adipose cell differentiation. *Mol Cell Endocrinol* 104, 201-211.
5. Kuri-Harcuch W (1982) Differentiation of 3T3-F442A cells into adipocytes is inhibited by retinoic acid. *Differentiation* 23, 164-169.
6. Alvarez R, de Andres J, Yubero P *et al.* (1995) A novel regulatory pathway of brown fat thermogenesis. Retinoic acid is a transcriptional activator of the mitochondrial uncoupling protein gene. *J Biol Chem* 270, 5666-5673.
7. Puigserver P, Vazquez F, Bonet ML *et al.* (1996) In vitro and in vivo induction of brown adipocyte uncoupling protein (thermogenin) by retinoic acid. *Biochem J* 317, 827-833.
8. Bonet ML, Oliver J, Pico C *et al.* (2000) Opposite effects of feeding a vitamin A-deficient diet and retinoic acid treatment on brown adipose tissue uncoupling protein 1 (UCP1), UCP2 and leptin expression. *J Endocrinol* 166, 511-517.
9. Ribot J, Felipe F, Bonet ML *et al.* (2001) Changes of adiposity in response to vitamin A status correlate with changes of PPAR gamma 2 expression. *Obes Res* 9, 500-509.
10. Harrison EH & Hussain MM (2001) Mechanisms involved in the intestinal digestion and absorption of dietary vitamin A. *J Nutr* 131, 1405-1408.
11. Serra F, Bonet ML, Puigserver P *et al.* (1999) Stimulation of uncoupling protein 1 expression in brown adipocytes by naturally occurring carotenoids. *Int J Obes Relat Metab Disord* 23, 650-655.
12. Shabalina IG, Backlund EC, Bar-Tana J *et al.* (2008) Within brown-fat cells, UCP1-mediated fatty acid-induced uncoupling is independent of fatty acid metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1777, 642-650.
13. Wang XD (1994) Review: absorption and metabolism of beta-carotene. *J Am Coll Nutr* 13, 314-325.
14. Ribaya-Mercado JD, Fox JG, Rosenblad WD *et al.* (1992) Beta-carotene, retinol and retinyl ester concentrations in serum and selected tissues of ferrets fed beta-carotene. *J Nutr* 122, 1898-1903.
15. Parker RS (1996) Absorption, metabolism, and transport of carotenoids. *Faseb J* 10, 542-551.
16. Wang XD, Krinsky NI, Marini RP *et al.* (1992) Intestinal uptake and lymphatic absorption of beta-carotene in ferrets: a model for human beta-carotene metabolism. *Am J Physiol* 263, G480-486.

17. Gugger ET, Bierer TL, Henze TM *et al.* (1992) Beta-carotene uptake and tissue distribution in ferrets (*Mustela putorius furo*). *J Nutr* 122, 115-119.
18. White WS, Peck KM, Ulman EA *et al.* (1993) The ferret as a model for evaluation of the bioavailabilities of all-trans-beta-carotene and its isomers. *J Nutr* 123, 1129-1139.
19. Wang XD, Liu C, Bronson RT *et al.* (1999) Retinoid signaling and activator protein-1 expression in ferrets given beta-carotene supplements and exposed to tobacco smoke. *J Natl Cancer Inst* 91, 60-66.
20. Ribaya-Mercado JD, Holmgren SC, Fox JG *et al.* (1989) Dietary beta-carotene absorption and metabolism in ferrets and rats. *J Nutr* 119, 665-668.
21. SCF (2000) Scientific Committee on Food. Opinion on the tolerable upper intake level of beta-carotene. In [http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out80b\\_en.pdf](http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out80b_en.pdf) 85
22. Murano I, Morroni M, Zingaretti MC *et al.* (2005) Morphology of ferret subcutaneous adipose tissue after 6-month daily supplementation with oral beta-carotene. *Biochim Biophys Acta* 1740, 305-312.
23. Fuster A, Pico C, Sanchez J *et al.* (2007) Effects of 6-month daily supplementation with oral beta-carotene in combination or not with benzo[a]pyrene on cell-cycle markers in the lung of ferrets. *J Nutr Biochem*.
24. Hara A & Radin NS (1978) Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Anal Biochem* 90, 420-426.
25. Rodriguez-Sureda V & Peinado-Onsurbe J (2005) A procedure for measuring triacylglyceride and cholesterol content using a small amount of tissue. *Anal Biochem* 343, 277-282.
26. Kissane JM & Robins E (1958) The fluorometric measurement of deoxyribonucleic acid in animal tissues with special reference to the central nervous system. *J Biol Chem* 233, 184-188.
27. Sanchez J, Oliver P, Miralles O *et al.* (2005) Leptin orally supplied to neonate rats is directly uptaken by the immature stomach and may regulate short-term feeding. *Endocrinology* 146, 2575-2582.
28. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
29. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
30. Fuster A, Oliver P, Sanchez J *et al.* (2009) UCP1 and oxidative capacity of adipose tissue in adult ferrets (*Mustela putorius furo*). *Comp Biochem Physiol - Part A: Molecular & Integrative Physiology*, in press.
31. Cinti S (2001) The adipose organ: morphological perspectives of adipose tissues. *Proc Nutr Soc* 60, 319-328.
32. Nedergaard J, Bengtsson T & Cannon B (2007) Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293, E444-452.

33. Bonet ML, Puigserver P, Serra F *et al.* (1997) Retinoic acid modulates retinoid X receptor alpha and retinoic acid receptor alpha levels of cultured brown adipocytes. *FEBS Lett* 406, 196-200.
34. Ribaya-Mercado JD, Lopez-Miranda J, Ordovas JM *et al.* (1993) Distribution of beta-carotene and vitamin A in lipoprotein fractions of ferret serum. Effect of beta-carotene supplementation. *Ann N Y Acad Sci* 691, 232-237.
35. Johnson EJ, Suter PM, Sahyoun N *et al.* (1995) Relation between beta-carotene intake and plasma and adipose tissue concentrations of carotenoids and retinoids. *Am J Clin Nutr* 62, 598-603.

**Table 1. Effects of beta-carotene supplementation for 6 months on body weight and size of adipose tissue depots.**

		<b>Control</b>	<b>BC 0.8</b>	<b>BC 3.2</b>	
Body weight (g)	Initial	571 ± 20	561 ± 28	587 ± 14	
	Final	922 ± 44 <sup>a</sup>	898 ± 25 <sup>a</sup>	1050 ± 18 <sup>b</sup>	T
Adipose weights (g)	Retroperitoneal	19.2 ± 2.5	18.5 ± 1.3	23.5 ± 2.3	
	Inguinal	42.0 ± 4.3	40.9 ± 2.8	48.8 ± 1.6*	
	Mesenteric	46.1 ± 5.3	36.2 ± 3.4	45.3 ± 4.6	
	Gonadal	2.41 ± 0.40	2.25 ± 0.33	2.80 ± 0.12	
	Interscapular	4.41 ± 0.50	4.26 ± 0.49	5.45 ± 0.62	

Animals were supplemented for 6 months with 0.8 mg beta-carotene/Kg body weight/day (BC 0.8), with 3.2 mg beta-carotene/Kg body weight/day (BC 3.2), or with the vehicle (control group, C). Initial body weight, before starting BC treatment, and final body weight, after 6 months treatment, are indicated. Results are expressed in grams as means ± SEM of 6 animals per group. T: effect of treatment, (p<0.05, one-way ANOVA); a≠b (LSD post-hoc test). \*, p<0.05 BC 3.2 vs. BC 0.8, Student's *t*-test.

**Table 2.** Effects of beta-carotene supplementation for 6 months on features of different adipose tissue depots.

		<b>Control</b>	<b>BC 0.8</b>	<b>BC 3.2</b>	
Retroperitoneal	Lipid content (mg/g tissue)	721 ± 105	938 ± 133	1219 ± 239	
	DNA content (µg/g tissue)	457 ± 18 <sup>a</sup>	271 ± 14 <sup>b</sup>	312 ± 39 <sup>b</sup>	T
	Lipid/DNA	1.56 ± 0.19 <sup>a</sup>	3.48 ± 0.49 <sup>b</sup>	4.24 ± 1.26 <sup>b</sup>	T
	Area of unilocular cells (µm <sup>2</sup> )	1960 ± 483	2486 ± 351	2717 ± 384	
Inguinal	Lipid content (mg/g tissue)	877 ± 81	849 ± 87	692 ± 101	
	DNA content (µg/g tissue)	232 ± 14 <sup>ab</sup>	189 ± 25 <sup>a</sup>	289 ± 19 <sup>b</sup>	T
	Lipid/DNA	3.91 ± 0.44 <sup>ab</sup>	4.88 ± 0.86 <sup>a</sup>	2.51 ± 0.47 <sup>b</sup>	T
	Area of unilocular cells (µm <sup>2</sup> )	3152 ± 519	3702 ± 509	3780 ± 349	
Interscapular	Lipid content (mg/g tissue)	391 ± 118	499 ± 64	389 ± 119	
	DNA content (µg/g tissue)	270 ± 43	332 ± 19	262 ± 53	
	Lipid/DNA	1.42 ± 0.43	1.50 ± 0.17	1.64 ± 0.51	
	Area of unilocular cells (µm <sup>2</sup> )	2962 ± 477	3565 ± 659	4041 ± 629	

Lipid and DNA contents were measured as described in the material and methods section. The mean area of unilocular cells was calculated by measuring the area of 100 unilocular cells for each tissue. T: effect of treatment, (p<0.05, one-way ANOVA); a≠b (LSD post-hoc test). Results are expressed as means ± SEM (n=5-6).



**Table 3. Effects of retinoic acid supplementation for 7 days on body weight and the size of adipose tissue depots.**

		<b>Control</b>	<b>RA 0.25</b>	<b>RA 25</b>
Body weight (g)	Initial	864 ± 67	869 ± 42	863 ± 60
	Final	855 ± 97	862 ± 47	884 ± 63
Adipose weights (g)	Retroperitoneal	22.1 ± 3.7	19.0 ± 2.6	19.4 ± 3.6
	Inguinal	41.0 ± 6.5	35.4 ± 4.9	39.5 ± 4.3
	Mesenteric	47.6 ± 8.3	40.8 ± 5.0	45.8 ± 6.0
	Gonadal	4.21 ± 0.69	3.49 ± 0.60	3.58 ± 0.70
	Interscapular	1.21 ± 0.22	1.08 ± 0.15	1.13 ± 0.21

Animals were supplemented for 7 days with 0.25 mg retinoic acid/Kg body weight/day (RA 0.25), with 25 mg retinoic acid/Kg body weight/day (RA 25), or with the vehicle (control group, C). Initial body weight, before starting RA treatment, and final body weight, after 6 months treatment, is indicated. Results are expressed in grams as means ± SEM of 6 animals per group.

**Table 4.** Effects of retinoic acid supplementation for 7 days on features of different adipose tissue depots.

		<b>Control</b>	<b>RA 0.25</b>	<b>RA 25</b>	
Retroperitoneal	Lipid content (mg/g tissue)	623 ± 44	587 ± 32	545 ± 47	
	DNA content (µg/g tissue)	415 ± 69	505 ± 110	657 ± 115	
	Lipid/DNA	1.93 ± 0.57	1.61 ± 0.46	1.02 ± 0.25	
	Area of unilocular cells (µm <sup>2</sup> )	3024 ± 361	2259 ± 549	2777 ± 534	
Inguinal	Lipid content (mg/g tissue)	490 ± 37	547 ± 51	555 ± 32	
	DNA content (µg/g tissue)	376 ± 36	474 ± 112	351 ± 81	
	Lipid/DNA	1.35 ± 0.14	1.78 ± 0.64	2.21 ± 0.62	
	Area of unilocular cells (µm <sup>2</sup> )	3808 ± 344 <sup>a</sup>	2536 ± 349 <sup>b</sup>	3927 ± 330 <sup>a</sup>	<b>T</b>
Interscapular	Lipid content (mg/g tissue)	501 ± 114	517 ± 51	439 ± 52	
	DNA content (µg/g tissue)	230 ± 49	369 ± 21	260 ± 30	
	Lipid/DNA	2.41 ± 0.35 <sup>a</sup>	1.43 ± 0.17 <sup>b</sup>	1.73 ± 0.15 <sup>b</sup>	<b>T</b>
	Area of unilocular cells (µm <sup>2</sup> )	4189 ± 548	3824 ± 921	3783 ± 804	

Lipid and DNA contents were measured as described in the material and methods section. The mean area of unilocular cells was calculated by measuring the area of 100 unilocular cells for each tissue. T: effect of treatment, (p<0.05, one-way ANOVA); a≠b (LSD post-hoc test). Results are expressed as means ± SEM (n=5-6).

Figure 1. A: Immunostaining for UCP1 in the retroperitoneal adipose tissue in ferrets supplemented for 6 months with 0.8 mg beta-carotene/Kg body weight/day (BC 0.8), or with 3.2 mg beta-carotene/Kg body weight/day (BC 3.2), or with the vehicle (control group). This fat depot in control animals displayed substantial amounts of multilocular cells, positive for UCP1, surrounded by unilocular white cells. BC supplementation resulted in a reduction in the amount of multilocular cells. Light microscopy. Scale bar 12  $\mu\text{m}$ . B: Percentage of the area of multilocular cells in the retroperitoneal adipose tissue in control and BC treated animals determined by using a morphological imaging system. Results represent the mean  $\pm$  SEM (n=4-5). A total area of 1 mm<sup>2</sup> was analyzed for each animal. C: Specific UCP1 in different adipose tissue depots (retroperitoneal, inguinal and interscapular) in control and BC treated ferrets, measured by Western blot. Data are expressed as percentage of the value of the retroperitoneal depot in control animals that was set as 100%. Results represent the mean  $\pm$  SEM (n=5-6). TxD: interaction of BC treatment and the adipose depot (two-way ANOVA, p<0.05). Within each depot, bars not sharing a common letter (a, b, c) are significantly different (one-way ANOVA, p<0.05).

Figure 2. A: Immunostaining for UCP1 in the retroperitoneal adipose tissue in ferrets supplemented for 7 days with 0.25 mg retinoic acid/Kg body weight/day (RA 0.25), or with 25 mg retinoic acid/Kg body weight/day (RA 25), or with the vehicle (control group). RA resulted in an increase in the amount of multilocular cells, positive for UCP1. Light microscopy. Scale bar 12  $\mu\text{m}$ . B: Percentage of the area of multilocular cells in the retroperitoneal adipose tissue in control and RA treated animals determined by using a morphological imaging system. Results represent the mean  $\pm$  SEM (n=4-5). A total area of 1 mm<sup>2</sup> was analyzed for each animal. C: Specific UCP1 in different adipose tissue depots (retroperitoneal, inguinal and interscapular) in control and RA treated ferrets, measured by Western blot. Data are expressed as percentage of the value of the retroperitoneal depot in control animals that was set as 100%. Results represent the mean  $\pm$  SEM (n=5-6). TxD: interaction of BC treatment and the adipose depot (two-way ANOVA, p<0.05). Within each depot, bars not sharing a common letter (a, b, c) are significantly different (one-way ANOVA, p<0.05).





Figure 1

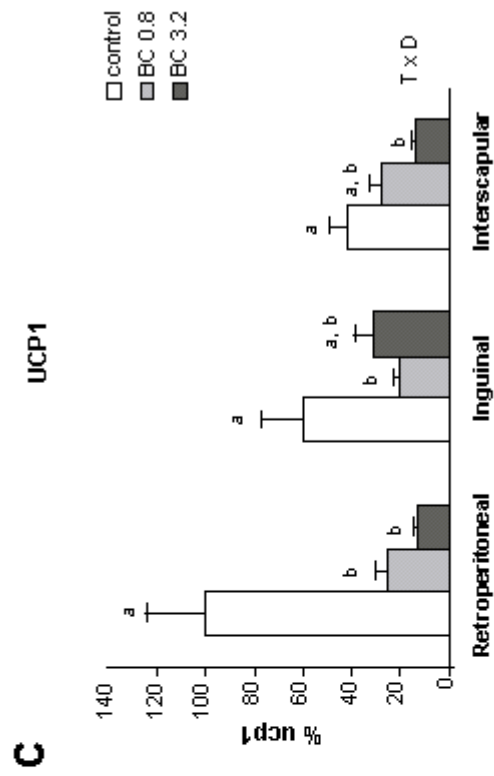
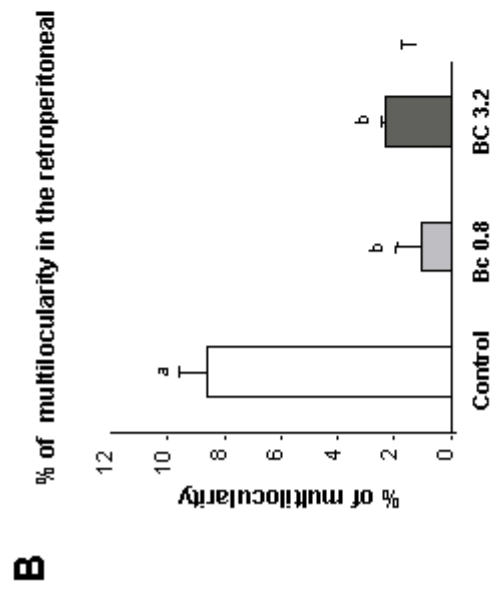
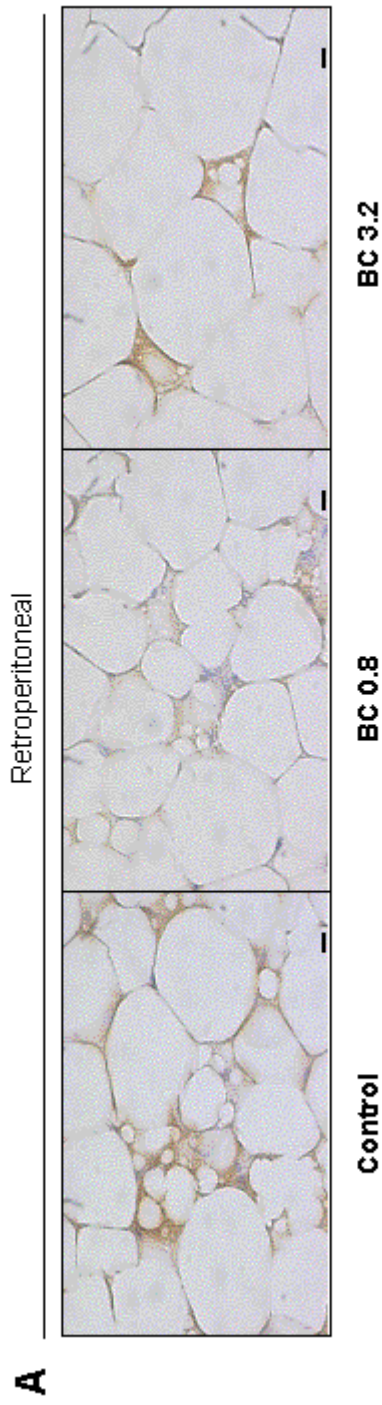
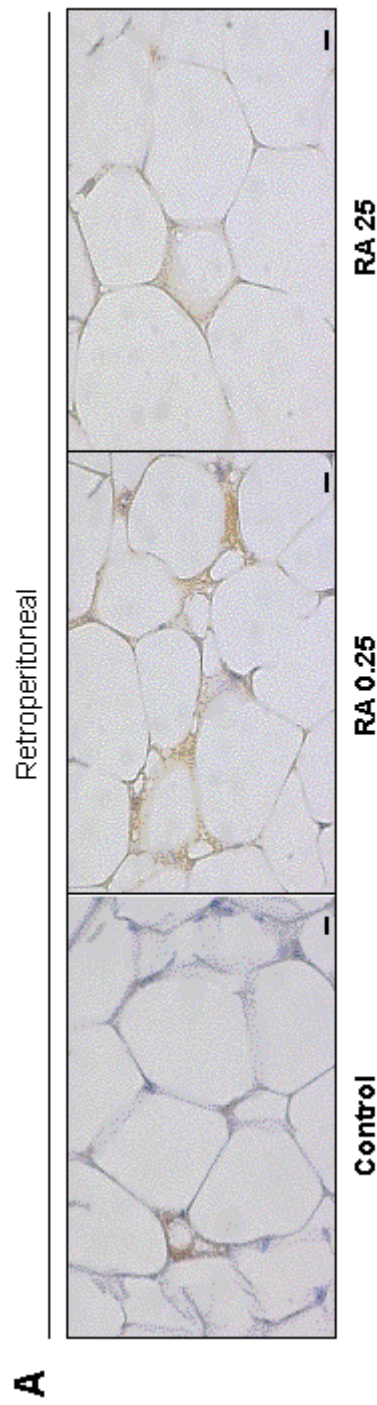
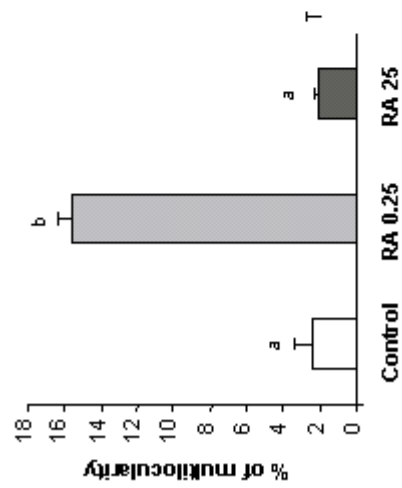


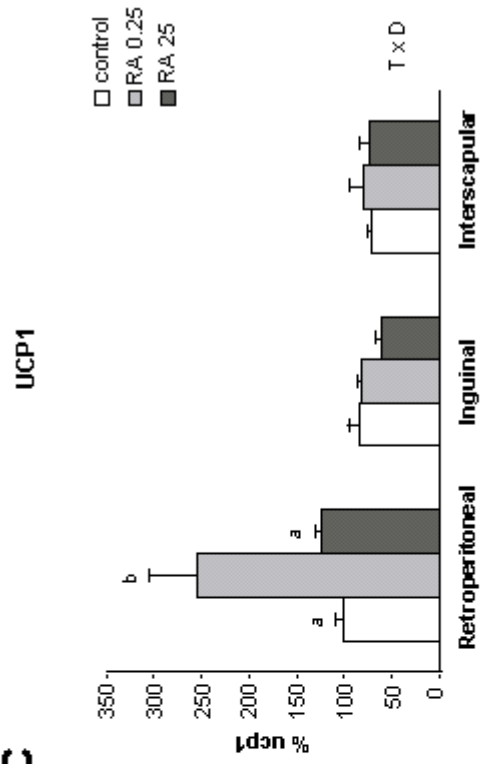
Figure 2



**B** % of multilocularity in the retroperitoneal



**C**





## **5. RECAPITULACIÓ**



L' absorció intestinal del BC de la dieta, així com la seva conversió a retinoides, és específica de cada espècie. En aquest estudi, per adreçar els efectes del BC de la dieta s'ha utilitzat la fura com a animal d'experimentació, perquè representa un model interessant ja que absorbeix la major part del BC de la dieta de manera intacta, de manera molt similar als humans, mentre que els rosegadors metabolitzen pràcticament tot el BC ingerit a l'intestí i no acumulen BC als teixits.

### **5.1 Efectes del $\beta$ -carotè sobre marcadors de proliferació cel·lular al pulmó**

Estudis previs de suplementació amb  $\beta$ -carotè (BC) cristal·lí pur tot-*trans* a fures havien demostrat que l'administració d'una dosi de 2,4mg BC/kg/dia durant sis mesos augmentava l'expressió de gens implicats en la progressió del cicle cel·lular o oncogens com l'AP-1 (c-Jun i c-Fos), ciclina D1 i PCNA al pulmó, mentre que una dosi més baixa, de 0,43mg BC/kg/dia, durant el mateix període no tenia efectes adversos i fins i tot podia protegir envers els danys causats pel fum de les cigarretes de tabac [49], suggerint que l'estimulació o no d'oncogens i gens que indueixen la progressió en el cicle cel·lular depenia de la dosi administrada. En el nostre cas, realitzant el tractament també en fures i durant sis mesos, i fins i tot administrant dosis de BC una mica més elevades (0,8mg BC/kg/dia i 3,2mg BC/kg/dia) i assolint nivells semblants de BC a plasma, no vam detectar un augment de la proliferació cel·lular al pulmó estudiant els mateixos marcadors, ni senyals de lesions per metaplàsia escamosa. Per altra banda, no observàrem signes evidents de carcinogènesi pulmonar pel tractament amb benzo[a]pirè (BP) però sí signes de major proliferació cel·lular.

La suplementació amb BC als animals tractats amb aquest agent cancerigen podria prevenir l'excés de proliferació cel·lular, ja que restableix els nivells augmentats de proteïna c-Jun i d'ARNm de la ciclina D1 als animals tractats amb BP. Cal destacar que en el nostre estudi, a diferència de l'estudi abans comentat [49], el BC era administrat en forma d'un preparat soluble en aigua on el BC venia acompanyat d'altres antioxidants ( $\alpha$ -tocoferol i palmitat d'ascorbil). Així i tot, s'ha de dir que vam observar que la suplementació amb la dosi alta de BC podria disminuir la senyalització al pulmó de l'RAR-beta, la qual cosa és similar

al que passa amb l'agent cancerígen BP i a allò que s'havia trobat a l'estudi previ amb la dosi més alta de BC [49], encara que aparentment no es produeixi un increment en la proliferació cel·lular al pulmó. Aquests estudis per tant mostren efectes diferents del BC quan es subministra en forma aïllada de quan es subministra combinat amb antioxidants. Els antioxidants presents en la formulació del BC podrien tenir un efecte estabilitzador del BC, mentre que, en absència d'antioxidants, es podria afavorir la formació de productes resultants de la ruptura asimètrica del BC (apo-carotenals i altres), que podrien ser els responsables dels efectes negatius del BC, estimulants la proliferació de les cèl·lules pulmonars, tal com mostraven els estudis previs mencionats [49, 93]. En definitiva, aquests resultats juntament amb les evidències prèvies suggereixen que l'efecte promotor o protector del BC en el càncer de pulmó pot dependre no només de la dosi sinó de la formulació en què el BC és administrat.

D'altra banda, aquests resultats, que mostren diferents efectes del BC segons la matriu en què es subministra, poden ajudar a aclarir els resultats aparentment contradictoris en humans dels efectes del BC, concretament entre els estudis epidemiològics mostrant que la ingesta de fruites i verdures (amb alt contingut en BC) així com de la presència de nivells elevats de BC al plasma tenen efectes beneficiosos i protectors en front al càncer (revisat a [67, 104]), respecte dels resultats dels estudis d'intervenció a humans amb BC mostrant efectes negatius en promoure el càncer de pulmó a individus fumadors o treballadors altament exposats a l'asbest [2, 62].

## **5.2 Efectes del $\beta$ -carotè sobre l'adipositat i l'expressió de la proteïna UCP1 al teixit adipós**

Tenint en compte que el BC pot estimular l'expressió d'UCP1 a adipòcits marrons en cultiu [84] i que a més és el precursor de l'àcid retinoic (AR), el qual s'ha descrit que és capaç d'afectar el balanç energètic de rosegadors (el tractament amb RA disminueix l'adipositat i el pes corporal [10, 69] i una dieta deficient en aquest compost l'augmenta [10] ens vam plantejar si el BC podia tenir també influència sobre el balanç energètic en el nostre model *in vivo*.

D'una banda, vam observar que el teixit adipós a les fures presenta unes característiques diferents respecte dels rosegadors, on el teixit adipós, tot i que presenta diferències importants segons la seva localització anatòmica, es pot distingir entre el que és el teixit adipós blanc i el marró. A les fures, no es troba un teixit adipós marró amb la localització interescapular com succeeix als rosegadors, amb expressió important i quasi exclusiva d'UCP1, sinó que aquest dipòsit a les fures presenta unes característiques més pròpies del que és el teixit adipós blanc pròpiament dit, amb un predomini d'adipòcits uniloculars i amb baix contingut d'UCP1. En canvi, el teixit adipós retroperitoneal a les fures presenta una proporció destacable d'adipòcits multiloculars, amb característiques semblants als típics adipòcits marrons, i a més presenten major capacitat oxidativa (major activitat de la proteïna mitocondrial COX), i nivells més elevats d'UCP1, respecte als altres dipòsits. Altres teixits estudiats, com el teixit inguinal (un dipòsit subcutani), presentà un predomini principal d'adipòcits uniloculars, i una expressió molt baixa d'UCP1.

L'expressió d'UCP1 al distints dipòsits de teixit adipós a la fura s'observà primer en condicions aproximades a les de termoneutralitat (22°C), però considerant el conegut efecte del fred estimulants la termogènesis al teixit adipós marró als rosegadors, vam estudiar a les fures l'efecte de l'exposició al fred durant una setmana sobre el contingut d'UCP1 als distints dipòsits de teixit adipós, així com els seus possibles efectes sobre la plasticitat del teixit adipós. Vam observar que el fred produïa també a aquests animals un augment de la capacitat termogènica, en termes d'un augment dels nivells d'UCP1 als teixits adiposos interescapular i al retroperitoneal, així com un augment de la presència d'adipòcits multiloculars, positius per la UCP1, als dos teixits citats, però més important i significatiu al dipòsit retroperitoneal. Encara que no es coneixen els mecanismes implicats en l'augment relatiu del contingut de cèl·lules multiloculars, s'ha proposat que podria ocórrer per transdiferenciació d'adipòcits blancs ja existents, encara que no es pot descartar que sigui per proliferació de precursors d'adipòcits marrons ja existents, o per una disminució de l'àrea de cèl·lules uniloculars.

La manca d'un teixit adipós marró clarament diferenciat, amb localització interescapular a les fures, a diferència del que passa als rosegadors, suggereix que les fures podrien ser un model interessant per a estudis de termogènesi i transdiferenciació més semblant als humans, que tal com s'ha evidenciat recentment tenen també depòsits de teixit adipós marró, però amb diferent localització respecte dels rosegadors.

D'altra banda, i tornant al que va ser un dels objectius de l'estudi, és a dir, esbrinar l'efecte de la suplementació durant sis mesos amb dues dosis diferents de BC a la fura sobre l'adipositat i la capacitat termogènica, vam observar que el BC tenia efectes sobre l'adipositat, però al contrari del que esperàvem, l'administració d'una dosi farmacològica de BC (3,2mg BC/kg/dia) va resultar en un augment del pes corporal dels animals, l'adipositat (concretament s'observà un increment significatiu del tamany del teixit adipós inguinal, així com una hipertròfia dels adipòcits de distintes localitzacions anatòmiques) i la vasculogènesi del teixit adipós. A més, el tractament amb BC va resultar en un descens de la quantitat de cèl·lules multiloculars, particularment al depòsit retroperitoneal. Els canvis a la morfologia del teixit adipós van anar associats amb un descens del contingut d'UCP1, també més marcat al teixit retroperitoneal, però també significatiu als depòsits inguinal i interescapular.

Aquests resultats dels efectes del BC a la fura, diferents dels descrits per a l'AR a rosegadors, i per al BC en cultius cel·lulars, feia pensar que el BC no era convertit en AR als teixits d'aquests animals. Una altra possibilitat podria ser que l'AR tingués en aquests animals efectes diferents dels descrits a rosegadors.

Per descartar que els efectes observats del BC es poguessin explicar per efectes diferents de l'AR a la fura respecte dels descrits als rosegadors, vam estudiar l'efecte de la suplementació durant 7 dies amb dues dosis diferents d'AR. Si bé la suplementació crònica amb BC augmentà el pes corporal dels animals i el tamany dels adipòcits blancs i disminuï la proporció d'adipòcits multiloculars i el contingut en UCP1 als diferents dipòsits, associant-se a la disminució de la capacitat termogènica dels teixits adiposos (especialment el retroperitoneal), aquests efectes no es van produir quan el tractament fou agut

amb AR, essent els canvis produïts per l'AR semblants als que produeix aquest compost en rosegadors, és a dir, tendència a disminuir l'adipositat i la quantitat de lípids a les cèl·lules adiposes a més d'augmentar el contingut en UCP1 de manera dependent de la dosi. Per tant, aquests resultats suggereixen que les diferències entre els efectes del BC i l'AR sobre l'adipositat i la capacitat termogènica a la fura podrien atribuir-se al diferent metabolisme del BC en aquests animals experimentals, particularment a la escassa conversió del BC en AR. De fet, al nostre estudi no vam detectar un augment dels nivells d'AR en el plasma amb el tractament amb BC. Ara bé, fins i tot considerant que la formació d'AR és molt baixa i insuficient per permetre observar els efectes descrits d'aquest compost, per què el BC resulta en efectes d'alguna manera contraris als de l'AR, queda pendent d'ésser esbrinat. Una possible explicació podria ser que un aport excessiu de BC resultàs en una menor senyalització de l'AR en el teixit adipós, directament o com a resultat de la seva conversió en altres productes de metabolització diferents dels originats amb la ruptura simètrica.









## **6. CONCLUSIONS**



1- A fures, l'administració diària per via oral de  $\beta$ -carotè (BC) en forma de preparat soluble en aigua acompanyat d'altres antioxidants ( $\alpha$ -tocoferol i palmitat d'ascorbil), en dosis de 0,8 i 3,2 mg/kg animal/dia durant sis mesos, produeix un augment dels nivells plasmàtics d'aquest compost de manera depenent de la dosi, amb unes pautes similars a allò observat en humans i contrari a allò observat en rosegadors, en els quals pràcticament tot el BC és transformat a les cèl·lules intestinals i no passa, com a BC com a tal, a la circulació sanguínia.

2- A diferència d'estudis previs, on l'administració de BC cristal·lí pur a les fures augmenta els nivells de marcadors de proliferació cel·lular, l'administració de l'esmentada preparació de BC en dosis de 0,8 i 3,2 mg/kg animal/dia no augmenta els marcadors de proliferació cel·lular ni fa que apareguin senyals aparents de lesió per metaplàsia escamosa. Això suggereix que l'efecte del BC com a promotor o protector de processos precancerosos en el pulmó depèn no només de la dosi sinó de la matriu en què és administrat, de manera que, assumint la relació entre els efectes adversos del BC i els seus efectes prooxidants, possiblement la combinació de BC amb  $\alpha$ -tocoferol i palmitat d'ascorbil no indueix efectes prooxidants al pulmó de la fura.

3- El benzo[a]pirè (BP) administrat durant 10 setmanes fins a un total de 240mg/kg animal no dóna lloc a precarcinogènesi pulmonar però sí produeix un augment de l'expressió d'alguns marcadors de proliferació (la proteïna c-Jun i l'RNAm de la ciclina D1), efectes que es poden prevenir si el BP s'administra conjuntament amb la dosi de BC 0,8 mg/kg animal/dia.

4- Les característiques dels diferents dipòsits de teixit adipós de les fures (segons la seva localització anatòmica) són diferents de les dels rosegadors. És destacable que el teixit adipós interescapular de les fures no té aparença de teixit adipós marró, sinó que és més típicament blanc amb predomini d'adipòcits uniloculars i amb baix contingut en UCP1, mentre que el teixit adipós retroperitoneal de les fures té un contingut relativament destacable d'adipòcits

multiloculars amb característiques semblants als adipòcits marrons (major capacitat oxidativa i major contingut d'UCP1).

5- L'exposició de les fures al fred (4°C) incrementa la capacitat termogènica del teixit adipós estimada a partir de l'observació d'un augment del contingut d'UCP1 i de la proporció d'adipòcits multiloculars als teixits adiposos retroperitoneal i interescapular.

6- El tractament crònic amb BC a les fures resulta en un augment del pes corporal i de l'adipositat (amb la dosi de BC 3,2 mg/kg animal/dia) i en un descens del percentatge de multilocularitat en el depòsit retroperitoneal i dels nivells d'UCP1 en els distints depòsits de teixit adipós (segons la dosi). En canvi, l'administració aguda d'AR disminueix lleugerament l'adipositat i augmenta el contingut d'UCP1 (especialment la dosi de 0,25 mg/kg animal/dia). Per tant, l'AR, però no el BC, té a la fura efectes comparables als descrits per l'AR a rosegadors.

1- In ferrets,  $\beta$ -carotene (BC) oral daily administration in a water soluble formulation containing other antioxidants ( $\alpha$ -tocopherol and ascorbyl palmitate), in doses of 0,8 and 3,2 mg/kg body weight/day for six months, results in increased BC plasma levels in a dose-dependent manner, similarly to what occurs in humans and differently from what occurs in rodents, where almost the totality of the ingested BC is transformed in the intestinal cells and can not reach the blood circulation as BC itself.

2- Unlike previous studies where the administration of pure BC crystalline in ferrets increases cellular proliferation markers levels, the administration of the described preparation of BC in doses of 0,8 and 3,2 mg/kg body weight/day does not increase cellular proliferation markers nor induces the appearance of squamous metaplasia signals. This suggests that the promoter or protective effect on precarcinogen events in lung depends not only on the dose but also on the matrix in which BC is given, so that, taking into account the relationship between the adverse effects of BC and its prooxidant effects, probably the combination of BC with  $\alpha$ -tocopherol and ascorbyl palmitate does not induce prooxidant effects in ferrets' lung.

3- Benzo[a]pyrene (BP) given for 10 weeks up to a total of 240mg/kg body weight does not induce lung precarcinogenesis but it does increase some cellular proliferation markers expression (c-Jun protein and cyclin D1 mRNA), effects that can be prevented when BP is given together with the BC dose of 0,8 mg/kg body weight/day.

4- Characteristics from the different adipose tissue depots in ferrets (depending on its anatomic localization) are different from those of rodents. It is important to note that interscapular adipose tissue from ferrets does not resemble brown adipose tissue but resembles more white adipose tissue with prevalence of unilocular adipocytes and low UCP1 content, while retroperitoneal adipose tissue has an important content in multilocular adipocytes with characteristics similar to those of brown adipocytes (higher oxidative capacity and UCP1 content).

5- The exposition of ferrets to cold (4°C) increases adipose tissue thermogenic capacity in terms of an increase in the UCP1 content and in the proportion of multilocular adipocytes in retroperitoneal and interscapular adipose tissues.

6- BC chronic treatment in ferrets results in an increase in body weight and adiposity (with BC 3,2 mg/kg body weight/day dose) and in a decrease of multilocularity percentage in the retroperitoneal depot and in decreased UCP1 levels in the different adipose tissue depots (depending on the dose). But acute retinoic acid (RA) administration slightly decreases adiposity and increases UCP1 content (specially with the 0,25 mg/kg body weight/day dose). Thus, RA, but not BC, has in the ferrets comparable effects to those described for RA in rodents.

## **7. BIBLIOGRAFIA**





1. **The Alpha-Tocopherol, Beta Carotene Cancer Prevention Study Group.** The effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. *N Engl J Med* 330: 1029-35, 1994
2. **Albanes D, Heinonen OP, Taylor PR, Virtamo J, Edwards BK, Rautalahti M, Hartman AM, Palmgren J, Freedman LS, Haapakoski J, Barrett MJ, Pietinen P, Malila N, Tala E, Liippo K, Salomaa ER, Tangrea JA, Teppo L, Askin FB, Taskinen E, Erozan Y, Greenwald P, Huttunen JK.** Alpha-Tocopherol and beta-carotene supplements and lung cancer incidence in the alpha-tocopherol, beta-carotene cancer prevention study: effects of base-line characteristics and study compliance. *J Natl Cancer Inst* 88: 1560-70, 1996
3. **Altucci L, Gronemeyer H.** The promise of retinoids to fight against cancer. *Nat Rev Cancer* 1: 181-93, 2001
4. **Alvarez R, de Andres J, Yubero P, Vinas O, Mampel T, Iglesias R, Giral M, Villarroya F.** A novel regulatory pathway of brown fat thermogenesis. Retinoic acid is a transcriptional activator of the mitochondrial uncoupling protein gene. *J Biol Chem* 270: 5666-73., 1995
5. **Aranda A, Pascual A.** Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev* 81: 1269-304, 2001
6. **Balmer JE, Blomhoff R.** Gene expression regulation by retinoic acid. *J Lipid Res* 43: 1773-808, 2002
7. **Bastien J, Rochette-Egly C.** Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. *Gene* 328: 1-16, 2004
8. **Beyer P, Al-Babili S, Ye X, Lucca P, Schaub P, Welsch R, Potrykus I.** Golden Rice: introducing the beta-carotene biosynthesis pathway into rice endosperm by genetic engineering to defeat vitamin A deficiency. *J Nutr* 132: 506S-510S, 2002
9. **Billington CJ, Briggs JE, Grace M, Levine AS.** Effects of intracerebroventricular injection of neuropeptide Y on energy metabolism. *Am J Physiol* 260: R321-7, 1991
10. **Bonet ML, Oliver J, Pico C, Felipe F, Ribot J, Cinti S, Palou A.** Opposite effects of feeding a vitamin A-deficient diet and retinoic acid treatment on brown adipose tissue uncoupling protein 1 (UCP1), UCP2 and leptin expression. *J Endocrinol* 166: 511-7, 2000
11. **Bonet ML, Ribot J, Felipe E, Palou A.** Vitamin A and the regulation of fat reserves. *Cell Mol Life Sci* 60: 1311-21, 2003
12. **Bost F, Caron L, Marchetti I, Dani C, Le Marchand-Brustel Y, Binetruy B.** Retinoic acid activation of the ERK pathway is required for embryonic stem cell commitment into the adipocyte lineage. *Biochem J* 361: 621-7, 2002
13. **Bour G, Lalevee S, Rochette-Egly C.** Protein kinases and the proteasome join in the combinatorial control of transcription by nuclear retinoic acid receptors. *Trends Cell Biol* 17: 302-9, 2007
14. **Bradford MM.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-54., 1976
15. **Bray GA.** Reciprocal relation of food intake and sympathetic activity: experimental observations and clinical implications. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24 Suppl 2: S8-17, 2000
16. **Cannon B, Jacobsson A, Rehnmark S, Nedergaard J.** Signal transduction in brown adipose tissue recruitment: noradrenaline and beyond. *Int J Obes Relat Metab Disord* 20: S36-42, 1996
17. **Cannon B, Nedergaard J.** Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 84: 277-359, 2004
18. **Celis JE, Celis A.** Cell cycle-dependent variations in the distribution of the nuclear protein cyclin proliferating cell nuclear antigen in cultured cells: subdivision of S phase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 3262-6, 1985
19. **Cinti S,** The adipose organ. Editrice Kurtis srl, Milan, 1999

20. **Cinti S.** The role of brown adipose tissue in human obesity. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 16: 569-74, 2006
21. **Chaves GV, Pereira SE, Saboya CJ, Ramalho A.** Nutritional status of vitamin A in morbid obesity before and after Roux-en-Y gastric bypass. *Obes Surg* 17: 970-6, 2007
22. **Dani C, Smith AG, Dessolin S, Leroy P, Staccini L, Villageois P, Darimont C, Ailhaud G.** Differentiation of embryonic stem cells into adipocytes in vitro. *J Cell Sci* 110 (Pt 11): 1279-85, 1997
23. **De Flora S, Bagnasco M, Vainio H.** Modulation of genotoxic and related effects by carotenoids and vitamin A in experimental models: mechanistic issues. *Mutagenesis* 14: 153-72, 1999
24. **de Souza Valente da Silva L, Valeria da Veiga G, Ramalho RA.** Association of serum concentrations of retinol and carotenoids with overweight in children and adolescents. *Nutrition* 23: 392-7, 2007
25. **During A, Harrison EH.** Intestinal absorption and metabolism of carotenoids: insights from cell culture. *Arch Biochem Biophys* 430: 77-88, 2004
26. **Felipe F, Bonet ML, Ribot J, Palou A.** Up-regulation of muscle uncoupling protein 3 gene expression in mice following high fat diet, dietary vitamin A supplementation and acute retinoic acid-treatment. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27: 60-9, 2003
27. **Felipe F, Bonet ML, Ribot J, Palou A.** Modulation of resistin expression by retinoic acid and vitamin A status. *Diabetes* 53: 882-9, 2004
28. **Feve B.** Adipogenesis: cellular and molecular aspects. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 19: 483-99, 2005
29. **Franssen-van Hal NL, Bunschoten JE, Venema DP, Hollman PC, Riss G, Keijer J.** Human intestinal and lung cell lines exposed to beta-carotene show a large variation in intracellular levels of beta-carotene and its metabolites. *Arch Biochem Biophys* 439: 32-41, 2005
30. **Fu M, Wang C, Li Z, Sakamaki T, Pestell RG.** Minireview: Cyclin D1: normal and abnormal functions. *Endocrinology* 145: 5439-47, 2004
31. **Glover J, Redfearn ER.** The mechanism of the transformation of beta-carotene into vitamin A in vivo. *Process Biochem* 58: xv-xvi, 1954
32. **Hara A, Radin NS.** Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Anal Biochem* 90: 420-6, 1978
33. **Hecht SS.** Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 91: 1194-210, 1999
34. **Hennekens CH, Buring JE, Manson JE, Stampfer M, Rosner B, Cook NR, Belanger C, LaMotte F, Gaziano JM, Ridker PM, Willett W, Peto R.** Lack of effect of long-term supplementation with beta carotene on the incidence of malignant neoplasms and cardiovascular disease. *N Engl J Med* 334: 1145-9, 1996
35. **Jeyakumar SM, Vajreswari A, Sesikeran B, Giridharan NV.** Vitamin A supplementation induces adipose tissue loss through apoptosis in lean but not in obese rats of the WNIN/Ob strain. *J Mol Endocrinol* 35: 391-8, 2005
36. **Kanazawa S, Soucek L, Evan G, Okamoto T, Peterlin BM.** c-Myc recruits P-TEFb for transcription, cellular proliferation and apoptosis. *Oncogene* 22: 5707-11, 2003
37. **Karin M, Liu Z, Zandi E.** AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* 9: 240-6, 1997
38. **Keijer J, Bunschoten A, Palou A, Franssen-van Hal NL.** Beta-carotene and the application of transcriptomics in risk-benefit evaluation of natural dietary components. *Biochim Biophys Acta* 1740: 139-46, 2005
39. **Kersten S.** Peroxisome proliferator activated receptors and obesity. *Eur J Pharmacol* 440: 223-34, 2002
40. **Kiefer C, Hessel S, Lampert JM, Vogt K, Lederer MO, Breithaupt DE, von Lintig J.** Identification and characterization of a mammalian enzyme catalyzing the asymmetric oxidative cleavage of provitamin A. *J Biol Chem* 276: 14110-6, 2001

41. **Kim HS, Hausman DB, Compton MM, Dean RG, Martin RJ, Hausman GJ, Hartzell DL, Baile CA.** Induction of apoptosis by all-trans-retinoic acid and C2-ceramide treatment in rat stromal-vascular cultures. *Biochem Biophys Res Commun* 270: 76-80, 2000
42. **Kissane JM, Robins E.** The fluorometric measurement of deoxyribonucleic acid in animal tissues with special reference to the central nervous system. *J Biol Chem* 233: 184-8, 1958
43. **Kopecky J, Jezek P, Drahota Z, Houstek J.** Control of uncoupling protein in brown-fat mitochondria by purine nucleotides. Chemical modification by diazobenzenesulfonate. *Eur J Biochem* 164: 687-94, 1987
44. **Kumar MV, Scarpace PJ.** Differential effects of retinoic acid on uncoupling protein-1 and leptin gene expression. *J Endocrinol* 157: 237-43, 1998
45. **Kumar MV, Sunvold GD, Scarpace PJ.** Dietary vitamin A supplementation in rats: suppression of leptin and induction of UCP1 mRNA. *J Lipid Res* 40: 824-9, 1999
46. **Kuri-Harcuch W.** Differentiation of 3T3-F442A cells into adipocytes is inhibited by retinoic acid. *Differentiation* 23: 164-9, 1982
47. **Laemmli UK.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-5, 1970
48. **Lee CM, Boileau AC, Boileau TW, Williams AW, Swanson KS, Heintz KA, Erdman JW, Jr.** Review of animal models in carotenoid research. *J Nutr* 129: 2271-7, 1999
49. **Liu C, Wang XD, Bronson RT, Smith DE, Krinsky NI, Russell RM.** Effects of physiological versus pharmacological beta-carotene supplementation on cell proliferation and histopathological changes in the lungs of cigarette smoke-exposed ferrets. PG - 2245-53. *Carcinogenesis* 21: 2000
50. **Liu C, Russell RM, Wang XD.** Alpha-tocopherol and ascorbic acid decrease the production of beta-apo-carotenals and increase the formation of retinoids from beta-carotene in the lung tissues of cigarette smoke-exposed ferrets in vitro. *J Nutr* 134: 426-30, 2004
51. **Lotan R.** Retinoids in cancer chemoprevention. *Faseb J* 10: 1031-9, 1996
52. **Lotan R.** Roles of retinoids and their nuclear receptors in the development and prevention of upper aerodigestive tract cancers. *Environ Health Perspect* 105 Suppl 4: 985-8, 1997
53. **Lowell BB, Spiegelman BM.** Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature* 404: 652-60., 2000
54. **Lowell BB, Bachman ES.** Beta-Adrenergic receptors, diet-induced thermogenesis, and obesity. *J Biol Chem* 278: 29385-8, 2003
55. **Mangelsdorf DJ, Evans RM.** The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 83: 841-50, 1995
56. **Mangelsdorf DJ, Umesono, K. and Evans R. M.,** *The retinoids. Biology, chemistry and medicine.* 1994, New York: Raven Press.
57. **Miller KP, Ramos KS.** Impact of cellular metabolism on the biological effects of benzo[a]pyrene and related hydrocarbons. *Drug Metab Rev* 33: 1-35, 2001
58. **Murray T, Russell TR.** Inhibition of adipose conversion in 3T3-L2 cells by retinoic acid. *J Supramol Struct* 14: 255-66, 1980
59. **Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B.** Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293: E444-52, 2007
60. **Nelson HH, Kelsey KT.** The molecular epidemiology of asbestos and tobacco in lung cancer. *Oncogene* 21: 7284-8, 2002
61. **Olsen JA, Lakshman MR.** Carotenoid conversions. *Methods Enzymol* 189: 425-32, 1990
62. **Omenn GS, Goodman GE, Thornquist MD, Balmes J, Cullen MR, Glass A, Keogh JP, Meyskens FL, Valanis B, Williams JH, Barnhart S, Hammar S.** Effects of a

- combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *N Engl J Med* 334: 1150-5, 1996
63. **Palou A, Pico C, Bonet ML, Oliver P.** The uncoupling protein, thermogenin. *Int J Biochem Cell Biol* 30: 7-11., 1998
  64. **Palou A, Serra F, Bonet ML, Pico C.** Obesity: molecular bases of a multifactorial problem. *Eur J Nutr* 39: 127-44, 2000
  65. **Palou A, Bonet ML, Pico C, Rodríguez AM.** Nutrigenómica y obesidad. *Rev Med Univ Navarra* 48: 36-48, 2004
  66. **Pereira S, Saboya C, Chaves G, Ramalho A.** Class III Obesity and its Relationship with the Nutritional Status of Vitamin A in Pre- and Postoperative Gastric Bypass. *Obes Surg* 2008
  67. **Peto R, Doll R, Buckley JD, Sporn MB.** Can dietary beta-carotene materially reduce human cancer rates? *Nature* 290: 201-8, 1981
  68. **Portillo MP, Serra F, Simon E, del Barrio AS, Palou A.** Energy restriction with high-fat diet enriched with coconut oil gives higher UCP1 and lower white fat in rats. *Int J Obes Relat Metab Disord* 22: 974-9, 1998
  69. **Puigserver P, Vazquez F, Bonet ML, Pico C, Palou A.** In vitro and in vivo induction of brown adipocyte uncoupling protein (thermogenin) by retinoic acid. *Biochem J* 317: 827-33., 1996
  70. **Puigserver P, Rhee J, Lin J, Wu Z, Yoon JC, Zhang CY, Krauss S, Mootha VK, Lowell BB, Spiegelman BM.** Cytokine stimulation of energy expenditure through p38 MAP kinase activation of PPARgamma coactivator-1. *Mol Cell* 8: 971-82, 2001
  71. **Reddy GP.** Cell cycle: regulatory events in G1-->S transition of mammalian cells. *J Cell Biochem* 54: 379-86, 1994
  72. **Rial E, Gonzalez-Barroso M, Fleury C, Iturrizaga S, Sanchis D, Jimenez-Jimenez J, Ricquier D, Gubern M, Bouillaud F.** Retinoids activate proton transport by the uncoupling proteins UCP1 and UCP2. *Embo J* 18: 5827-33, 1999
  73. **Ribot J, Felipe F, Bonet ML, Palou A.** Changes of adiposity in response to vitamin A status correlate with changes of PPAR gamma 2 expression. *Obes Res* 9: 500-9, 2001
  74. Ribot J, Bonet ML, Felipe F, Palou A, *Vitamin A and body weight control*, in *Study on 'Obesity and Functional Foods in Europe'*, A. Palou, Bonet, M.L., Serra, F., Editor. 2002: Luxembourg. p. 128-142.
  75. **Rock CL.** Carotenoids: biology and treatment. *Pharmacol Ther* 75: 185-97, 1997
  76. **Rodríguez-Sureda V, Peinado-Onsurbe J.** A procedure for measuring triacylglyceride and cholesterol content using a small amount of tissue. *Anal Biochem* 343: 277-82, 2005
  77. **Rodríguez VM, Portillo MP, Pico C, Macarulla MT, Palou A.** Olive oil feeding up-regulates uncoupling protein genes in rat brown adipose tissue and skeletal muscle. *Am J Clin Nutr* 75: 213-20, 2002
  78. **Rothwell NJ, Stock MJ.** A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis. *Nature* 281: 31-5, 1979
  79. **Russell RM.** The enigma of beta-carotene in carcinogenesis: what can be learned from animal studies. *J Nutr* 134: 262S-268S, 2004
  80. **Sadurskis A, Dicker A, Cannon B, Nedergaard J.** Polyunsaturated fatty acids recruit brown adipose tissue: increased UCP content and NST capacity. *Am J Physiol* 269: E351-60, 1995
  81. **Safonova I, Darimont C, Amri EZ, Grimaldi P, Ailhaud G, Reichert U, Shroot B.** Retinoids are positive effectors of adipose cell differentiation. *Mol Cell Endocrinol* 104: 201-11, 1994
  82. **SCF. Scientific Committee on Food.** *Opinion on the tolerable upper intake level of beta-carotene.* [http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out80b\\_en.pdf](http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out80b_en.pdf) 2000
  83. **Schectman G, Byrd JC, Gruchow HW.** The influence of smoking on vitamin C status in adults. *Am J Public Health* 79: 158-62, 1989

84. **Serra F, Bonet ML, Puigserver P, Oliver J, Palou A.** Stimulation of uncoupling protein 1 expression in brown adipocytes by naturally occurring carotenoids. *Int J Obes Relat Metab Disord* 23: 650-5., 1999
85. Serrano Ríos M CJ, Carraro R, Gutiérrez Fuentes JA, *The metabolic syndrome at the beginning of the XXIst century. A genetic and molecular approach.* 2005, Madrid: Elsevier.
86. **Shaulian E, Karin M.** AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene* 20: 2390-400, 2001
87. **Shaulian E, Karin M.** AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol* 4: E131-6, 2002
88. **Tang GW, Wang XD, Russell RM, Krinsky NI.** Characterization of beta-apo-13-carotenone and beta-apo-14'-carotenal as enzymatic products of the excentric cleavage of beta-carotene. *Biochemistry* 30: 9829-34, 1991
89. **Teruel T, Hernandez R, Benito M, Lorenzo M.** Rosiglitazone and retinoic acid induce uncoupling protein-1 (UCP-1) in a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent manner in fetal primary brown adipocytes. *J Biol Chem* 278: 263-9, 2003
90. **Villaca Chaves G, Pereira SE, Saboya CJ, Ramalho A.** Non-alcoholic fatty liver disease and its relationship with the nutritional status of vitamin A in individuals with class III obesity. *Obes Surg* 18: 378-85, 2008
91. **Villarroya F, Iglesias R, Giralt M.** Retinoids and retinoid receptors in the control of energy balance: novel pharmacological strategies in obesity and diabetes. *Curr Med Chem* 11: 795-805, 2004
92. **Wang XD, Krinsky NI, Marini RP, Tang G, Yu J, Hurley R, Fox JG, Russell RM.** Intestinal uptake and lymphatic absorption of beta-carotene in ferrets: a model for human beta-carotene metabolism. *PG - G480-6. Am J Physiol* 263: 1992
93. **Wang XD, Liu C, Bronson RT, Smith DE, Krinsky NI, Russell M.** Retinoid signaling and activator protein-1 expression in ferrets given beta-carotene supplements and exposed to tobacco smoke. *J Natl Cancer Inst* 91: 60-6, 1999
94. **Watanabe M, Yamamoto T, Mori C, Okada N, Yamazaki N, Kajimoto K, Kataoka M, Shinohara Y.** Cold-induced changes in gene expression in brown adipose tissue: implications for the activation of thermogenesis. *Biol Pharm Bull* 31: 775-84, 2008
95. **Weinberg RA.** The retinoblastoma gene and gene product. *Cancer Surv* 12: 43-57, 1992
96. **Weinberg RA.** How cancer arises. *Sci Am* 275: 62-70, 1996
97. **Wolf G.** Is 9-cis-retinoic acid the endogenous ligand for the retinoic acid-X receptor? *Nutr Rev* 64: 532-8, 2006
98. **Yeilding NM, Procopio WN, Rehman MT, Lee WM.** c-myc mRNA is down-regulated during myogenic differentiation by accelerated decay that depends on translation of regulatory coding elements. *J Biol Chem* 273: 15749-57, 1998
99. **Yeum KJ, Lee-Kim YC, Yoon S, Lee KY, Park IS, Lee KS, Kim BS, Tang G, Russell RM, Krinsky NI.** Similar metabolites formed from beta-carotene by human gastric mucosal homogenates, lipoxygenase, or linoleic acid hydroperoxide. *Arch Biochem Biophys* 321: 167-74, 1995
100. **Yeum KJ, Russell RM.** Carotenoid bioavailability and bioconversion. *Annu Rev Nutr* 22: 483-504, 2002
101. **Zhang M, Hu P, Krois CR, Kane MA, Napoli JL.** Altered vitamin A homeostasis and increased size and adiposity in the rdh1-null mouse. *Faseb J* 21: 2886-96, 2007
102. **Zhang XK, Liu Y, Lee MO.** Retinoid receptors in human lung cancer and breast cancer. *Mutat Res* 350: 267-77, 1996
103. **Zhang Z, Araghi-Niknam M, Liang B, Inserra P, Ardestani SK, Jiang S, Chow S, Watson RR.** Prevention of immune dysfunction and vitamin E loss by dehydroepiandrosterone and melatonin supplementation during murine retrovirus infection. *Immunology* 96: 291-7, 1999

104. **Ziegler RG, Mayne ST, Swanson CA.** Nutrition and lung cancer. *Cancer Causes Control* 7: 157-77, 1996
105. **Ziouzenkova O, Orasanu G, Sharlach M, Akiyama TE, Berger JP, Viereck J, Hamilton JA, Tang G, Dolnikowski GG, Vogel S, Duester G, Plutzky J.** Retinaldehyde represses adipogenesis and diet-induced obesity. *Nat Med* 13: 695-702, 2007
106. **Ziouzenkova O, Orasanu G, Sukhova G, Lau E, Berger JP, Tang G, Krinsky NI, Dolnikowski GG, Plutzky J.** Asymmetric cleavage of beta-carotene yields a transcriptional repressor of retinoid X receptor and peroxisome proliferator-activated receptor responses. *Mol Endocrinol* 21: 77-88, 2007

## **Annex: detalls de les tècniques utilitzades**

1. Quantificació dels nivells d'ADN
2. Aïllament i quantificació d'ARN
3. Determinació dels nivells d'expressió d'ARNm específics per RT-PCR
4. Extracció i quantificació de proteïnes
5. Determinació de proteïnes específiques per *Western-blot*
6. Mesura de l'activitat COX
7. Determinació del contingut en lípids totals
8. Anàlisi del contingut en BC per cromatografia líquida d'alta definició (HPLC)
9. Preparació de mostres per a tècniques de microscòpia òptica
  - 9.1 Anàlisi morfològiques
  - 9.2 Anàlisi morfomètriques
  - 9.3 Vasculogènesi
  - 9.4 Immunohistoquímica









## 1. Quantificació dels nivells d'ADN

Per determinar la quantitat d'ADN dels teixits adiposos retroperitoneal, inguinal i interescapular, aquests eren homogenats en PBS (*phosphate-buffered saline*, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM i tampó fosfat 10 mM, pH 7,4) en una proporció 1:3 (pes:volum) amb un homogeneïtzador del tipus *polytron*. L'homogenat resultant es centrifugava a 500g durant 10min. Es recollia el sobrenedant que contenia l'ADN i es quantificava pel mètode fluorimètric de Kissane i Robins [42] utilitzant àcid 3,5-diaminobenzoic.

## 2. Aïllament i quantificació d'ARN

L'aïllament d'ARN a partir de mostres de pulmó es realitzava amb el mètode del Trizol (Invitrogen), reactiu que contenia fenol i isotiocianat de guanidina i que permetia la lisi de la mostra mantenint la integritat de l'ARN.

S'afegia 1ml de Trizol per cada 50mg de pulmó i s'homogeneïtzava en fred en un homogeneïtzador del tipus *polytron*. S'afegien 200ml de cloroform (Sigma) per cada mil·lilitre de Trizol i les mostres es mesclaven vigorosament amb un vòrtex durant 15s. Seguidament, les mostres s'incubaven en fred durant 2-15min i es procedia a la separació de l'ARN de les proteïnes centrifugant les mostres a 12000g durant 15min a 4°C. Es recollia la fase aquosa superior que contenia l'ARN i es guardava la fase inferior a -20°C per extreure les proteïnes d'aquestes mateixes mostres per a altres tècniques (vegeu apartat 4.1). La precipitació de l'ARN s'aconseguia mitjançant l'addició de 0,5ml d'isopropanol (Sigma) per cada mil·lilitre de Trizol emprat. Les mostres es mesclaven per inversió i es mantenien de 5 a 10min a -20°C, encara que habitualment s'hi mantenien durant tota la nit per augmentar el rendiment d'extracció. L'ARN es precipitava centrifugant les mostres a 12000g durant 10min a 4°C. Es descartava l'isopropanol i el precipitat d'ARN es netejava afegint 1ml d'etanol al 75% (Panreac). Les mostres s'agitaven amb vòrtex, es centrifugaven a 7500g durant 5min a 4°C i s'eliminava completament l'etanol. Els precipitats d'ARN es resuspenien en un volum adient (de 50 a 100µl aproximadament, segons la mostra) d'aigua lliure d'ARNases (Sigma) amb l'ajut de calor en un bany termostatitzat a 60°C i d'agitació per vòrtex.

L'ARN total extret es quantificava per espectrofotometria a 260nm amb l'espectròmetre Shimadzu, utilitzant 5µl de l'ARN aïllat en una dilució 1/10. Per valorar la puresa de l'ARN es mesurava la relació d'absorbància 260nm/280nm, que determina el grau de contaminació per proteïnes. Per valorar la qualitat o estat de l'ARN es corria un gel d'agarosa a l'1% amb bromur d'etidi, en tampó 0,5x tris-borat-EDTA, carregant entre 0,5 i 2µg d'ARN, corrent-lo uns 20min a 80V i captant després la imatge amb un transil·luminador.

### 3. Determinació dels nivells d'expressió d'ARNm específics per RT-PCR

Desnaturalització: 0,5µg d'ARN de les mostres (aïllat i quantificat com s'indica a l'apartat anterior) es completaven fins a 10µl amb aigua lliure d'ARNases (Sigma) i l'ARN es desnaturalitzava sotmetent les mostres durant 10min a 65°C, duent-les després a 4°C fins al següent pas.

Retrotranscripció (RT) o obtenció dels ADN complementaris (cDNA): per als ARN desnaturalitzats la retrotranscripció consistia en afegir a les mostres 15µl d'una mescla d'RT que contenia 2,5µl de tampó de retrotranscripció 10x (Promega), 2,5µl de MgCl<sub>2</sub> 25mM (Promega), 4µl de solució de dNTP 2,5mM (Invitrogen), 1µl de *random hexamers* 50UµM (Applied Biosystems), 1µl d'inhibidors d'ARNases 20U/µl (Applied Biosystems), 1µl de transcriptasa reversa 50U/µl (MuLV RT, *murine leukemia virus reverse transcriptase*, Applied Biosystems) i 3µl d'aigua lliure d'ARNases (Sigma). La reacció tenia lloc en les següents condicions: 15min a 20°C, 30min a 42°C, 5min a 95°C, guardant-les a 4°C fins al següent pas.

Reacció en cadena de la polimerasa (PCR): 5µl de la mescla d'RT (que contenia els cDNA) s'afegien a una mescla de PCR de 20µl composta per 2,5µl de tampó de PCR 10x (Promega), 2,5µl de MgCl<sub>2</sub> 25mM (Promega), 2µl de solució de dNTP 2,5mM (Invitrogen), 0,2µl de Taq polimerasa 5U/µl (Promega), una certa quantitat de *primers* del gen diana i una altra certa quantitat de *primers* del gen de referència (el que codifica per a la β-actina), depenent de la quantitat relativa entre el gen diana i el de referència. La reacció consistia en una desnaturalització a 95°C durant 1min i 45s, seguida d'un nombre variable de cicles (de 23 a 30 depenent del gen a estudiar) de desnaturalització a 95°C durant 15s, hibridació durant 15s a temperatura entre 54°C i 61°C (depenent del gen diana) i extensió a 72°C durant 30s. Finalment tenia lloc una extensió final de 7min a 72°C després del darrer cicle i a continuació les mostres es deixaven a 4°C.

Tot el procés es duia a terme en un termociclador Gene-Amp 9700 Thermal Cycler (Perkin-Elmer).

Els encebadors (*primers*) de cada un dels gens a amplificar (Genotek) van ser dissenyats en regions conservades d'altres espècies disponibles a la base de dades NCBI: rata (*Rattus norvegicus*), ratolí (*Mus musculus*), humà (*Homo sapiens*) i ca (*Canis familiaris*), ja que no es disposava de la seqüència dels gens a estudiar de la fura (*Mustela putorius furo*).

La visualització i quantificació dels productes de PCR es realitzava mitjançant electroforesi en gel d'agarosa (Pronadisa) al 2% tenyit amb bromur d'etidi (Sigma) en tampó 0,5x tris-borat-EDTA. A 10µl de cada producte de PCR se li afegien 5µl de tampó de càrrega (50% de glicerol (Sigma), 50% d'aigua i 2,5mg/ml de blau de bromofenol (Panreac)) i la mescla es carregava en el gel. A

més, es carregava un marcador de pesos moleculars de 100pb (Invitrogen) per verificar la mida dels productes. Les bandes es separaven aplicant una tensió de 90V a la font d'electroforesi durant uns 25min. La imatge del gel era captada amb un transil·luminador Chemigenius i el programa GeneSnap (Syngene) i les bandes de les imatges, quantificades amb el programa GeneTools (Syngene).

#### 4. Extracció i quantificació de proteïnes

L'extracció i quantificació de proteïnes es duia a terme de diferent manera depenent de la determinació que s'havia de fer posteriorment.

1) Per a la determinació per *Western-blot* de proteïnes implicades al cicle cel·lular (c-Jun, c-Fos, c-Myc, PCNA, ciclina D1, RAR $\beta$ ) al pulmó, la mostra de teixit era homogeneïtzada en fred amb Trizol (Invitrogen). La proporció era 1ml de Trizol per cada 50mg de pulmó. La homogeneïtzació es duia a terme amb homogeneïtzador del tipus *polytron*. S'afegien 200 $\mu$ l de cloroform (Sigma) per cada mil·lilitre de Trizol i les mostres es mesclaven vigorosament amb un vòrtex durant 15s. Seguidament, les mostres s'incubaven en fred durant 2-15min i es procedia a la separació de l'ARN de les proteïnes centrifugant les mostres a 12000g durant 15min a 4°C. Es guardava la fase superior que contenia l'ARN per aïllar-lo per a altres tècniques (vegeu apartat 2) i es recollia la fase inferior que contenia les proteïnes i l'ADN. En aquesta fase se li afegien 300 $\mu$ l d'etanol absolut, es mesclava diverses vegades per inversió i s'incubava de 2 a 3 minuts a temperatura ambient per precipitar l'ADN. Per acabar de descartar l'ADN es centrifugaven les mostres a 2000g durant 5min a 4°C, recollint el sobrenedant d'aquesta centrifugació que contenia les proteïnes lliures d'àcids nucleics. A aquest sobrenedant, s'hi afegien 1,5ml d'isopropanol, es mesclava diverses vegades per inversió i s'incubava 10min a temperatura ambient per centrifugar les mostres a continuació a 12000g i 4°C durant 10min, descartant el sobrenedant. Per netejar el precipitat, se li afegien 1,5ml de guanidina-HCl 0,3M en etanol del 95% i es rompia el sòlid amb ajuda d'una vareta de vidre, es mesclava amb vòrtex i s'incubaven les mostres a temperatura ambient durant 20min. Es centrifugaven les mostres a 7500g durant 5min a 4°C i el precipitat obtingut es sotmetia dues vegades més al procés de neteja. Després de repetir 3 vegades en total la neteja del precipitat de proteïnes, s'afegien 2ml d'etanol absolut al precipitat resultant, mesclant amb vòrtex i incubant les mostres 20min a temperatura ambient per després centrifugar-les a 7500g durant 5min a 4°C. Es recollia el precipitat del qual s'eliminava completament l'etanol absolut abans d'afegir 500 $\mu$ l d'SDS a l'1% a cada una de les mostres. Les mostres eren dissoltes en un bany termostatitzat a 50°C durant 1h. Una vegada dissoltes, es centrifugaven 10min a 10000g i a 4°C per eliminar materials insolubles que precipitaven i obtenir un sobrenedant de proteïnes dissoltes i purificades.

Finalment les proteïnes aïllades eren quantificades amb el kit *BCA protein assay* (Pierce), que fa servir el mètode basat en la reducció del Cu<sup>+2</sup> a Cu<sup>+1</sup> per proteïnes en un medi alcalí (reacció de

Biuret) i en la detecció colorimètrica del catió  $\text{Cu}^{+1}$  emprant l'àcid *bicinchoninic* (BCA). S'emprava com a patró de proteïnes albúmina bovina sèrica (Sigma) dissolta en el tampó en què es trobaven resuspeses finalment les proteïnes aïllades (SDS a l'1%). En una placa de 96 pouets s'afegien 25µl de mostra o de patró i 200µl d'una mescla de 50 parts de reactiu A (que contenia BCA) i 1 part de reactiu B (que contenia sulfat cúpric al 4%) a cada pouet. La placa es protegia de la llum i es mesclava el contingut dels pouets durant 30s. La reacció tenia lloc amb la placa protegida de la llum, a 37°C i durant 30min. Finalment es llegia l'absorbància a 562nm en un lector de plaques d'ELISA (Maghellaes, Sunrise).

2) Per a la determinació per *Western-blot* de la proteïna UCP1 als teixits adiposos les mostres eren homogeneïtzades a 4°C en PBS (NaCl 137mM, KCl 2,7 mM i fosfat sòdic mono/di-bàsic 10mM, tots els reactius de Panreac) amb inhibidors de proteases, en una proporció 1:5 (pes:volum) amb un homogeneïtzador del tipus *polytron*. L'homogenat resultant es centrifugava a 7000g durant 2min a 4°C i es recollia el sobrenedant que contenia les proteïnes a quantificar. En aquest cas, eren quantificades pel mètode de Bradford [14].

3) Per a la determinació de l'activitat COX als teixits adiposos, aquests eren homogeneïtzats immediatament després del sacrifici dels animals a 4°C en un tampó compost de sacarosa 250mM, EDTA 1mM i Tris-HCl 10mM a pH 7,4 en proporció 1:3 (pes:volum) emprant un homogeneïtzador de Tefló amb *potter* de vidre. L'homogenat resultant era centrifugat a 700g durant 10min a 4°C. El sobrenedant d'aquesta centrifugació era recollit i utilitzat per a la determinació de la quantitat de proteïnes totals pel mètode BCA (descriu prèviament) i per a la determinació de l'activitat COX. El precipitat resultant que contenia els mitocondris es resuspensia en un volum de 100 µL de tampó amb sacarosa 70mM, manitol 220mM, HEPES 2mM i EDTA 1mM i aquesta preparació era utilitzada per determinar el contingut en proteïnes mitocondrials, també pel mètode BCA.

## 5. Determinació de proteïnes específiques per *Western-blot*

La determinació dels nivells de proteïnes implicades al cicle cel·lular (c-Jun, c-Fos, c-Myc, PCNA, ciclina D1, RARβ) al pulmó i la dels nivells de proteïna UCP1 als diferents dipòsits de teixit adipós es realitzà per *Western-blot*.

Electroforesi en gel de poliacrilamida en presència d' SDS. Es va seguir el mètode Laemmli [47] amb algunes modificacions. En primer lloc es preparava el gel d'acrilamida per dur a terme la separació de proteïnes segons el seu pes molecular (*resolving gel*) mesclant 22,5ml de Tris-SDS pH 8,8, uns volums determinats d'una solució d'acrilamida (30%acrilamida - 0,8%bisacrilamida, 37,5:1) (Nacional Diagnostics) i aigua bidestil·lada fins a un total de 45ml. Aquests volums de solució d'acrilamida depenien del percentatge d'acrilamida al qual havíem de preparar el gel. Utilitzàrem gels de diferents percentatges d'acrilamida en funció de la mida de la proteïna a

resoldre: 15% per a les proteïnes implicades al cicle cel·lular a les mostres de pulmó i 10% per a la UCP1 dels teixits adiposos. Independentment del percentatge d'acrilamida del gel, s'afegien els polimeritzadors: 25µl de TEMED (Sigma) i 250µl de persulfat amònic al 10% (Panreac) preparat fresc. Es mesclaven tots els components i ràpidament s'introduïen al motlle de polimerització perfectament ensamblat (BioRad), afegint a sobre una capa de 3ml d'aigua bidestil·lada per evitar la inhibició de la polimerització del gel per acció de l'oxigen molecular. A continuació es preparava el gel de compactació (*stacking gel*) al 3% d'acrilamida, que servia per concentrar les mostres, mesclant 7,5ml de Tris-SDS pH 6,8, 1,5ml de la solució d'acrilamida i 6ml d'aigua bidestil·lada. Igualment també s'afegien els polimeritzadors: 20µl de TEMED i 200µl de persulfat amònic al 10%, es mesclava ràpidament i s'introduïa al motlle de polimerització, havent eliminat prèviament la capa d'aigua bidestil·lada que cobria el *resolving gel* acuradament amb un paper de filtre. Per acabar, s'afegia la pinta que determinaria els carrils on es carregarien després les mostres de proteïnes.

Una vegada polimeritzat el gel, es retirava la pinta i s'introduïa a la cubeta en tampó Tris-glicina pH 8,3 (Tris base 0,025M, glicina 0,192M 0,2% SDS) on es duria a terme a continuació la separació de les proteïnes. Es pipetejaven entre 30 i 80µg de mostra de proteïna total (depenent de l'abundància de la proteïna) i s'afegia a cada mostra 1µl de tampó de càrrega (12,5% de Tris-HCl 0,5M pH 6,8; 5% d' SDS, Sigma; 10% de glicerol, Sigma; 5% de 2-mercaptoetanol, Sigma; 0,25% de blau de bromofenol a l'1%, Panreac, la resta d'aigua bidestil·lada) per cada 10µg de proteïna de manera que la proporció proteïna:SDS fos 1:4. A continuació les mostres eren introduïdes de 2 a 5 minuts en aigua bullent per desnaturalitzar-les. Es carregaven les mostres de proteïnes en els gels d'acrilamida, incloent un marcador de pesos moleculars (Invitrogen) i un control positiu, si es disposava d'un. Les mostres es corrien en tampó Tris-glicina pH 8,3 (Tris base 0,025M, glicina 0,192M 0,2% SDS) vàries hores a 70V aproximadament.

Transferència. Una vegada separades les proteïnes al gel d'acrilamida, aquestes es transferien a una membrana de nitrocel·lulosa de 0,45µm (BioRad) amb un *electroblotter* semi-sec. Per això es banyava amb aigua bidestil·lada la placa inferior de l'*electroblotter* i a continuació es col·locaven a sobre una sèrie de fulls de paper Whatman nº3: 6 fulls banyats en tampó Tris 0,3M pH 10,4, 3 fulls banyats en tampó Tris 0,025M pH 10,4, la membrana de nitrocel·lulosa banyada també en tampó Tris 0,025M pH 10,4, el gel d'acrilamida de l'electroforesi de proteïnes realitzada i 9 fulls de paper Whatman nº3 banyats en tampó de càtode pH 9,4. Es col·locava, per acabar, la placa superior també banyada amb aigua bidestil·lada i es connectava l'aparell a una intensitat constant de 200mA durant 2h (a uns 20V aproximadament).

Per comprovar la transferència correcta i equitativa de les proteïnes del gel a la membrana s'utilitzava la tinció Ponceau-S (0,1% de Ponceau-S i 5% d'àcid acètic) per a les proteïnes implicades al cicle cel·lular o bé la tinció amb negre amido (0,1% de negre amido, 1% d'àcid

acètic i 40% de metanol). Ambdues tincions eren retirades completament abans de seguir amb el procés.

Immunodetecció. Seguidament es bloquejava la membrana amb PBS-T (PBS amb un 1% de Tween 20, Sigma) al 5% de llet en pols durant 1h, o bé amb 1% de llet en pols durant tot el vespre. Es realitzaven 3 rentats de 15, 5 i 5min amb PBS-T i després s'incubava amb una dilució de l'anticòs primari en PBS-T amb 0,1% d'albumina bovina sèrica (Sigma) i 0,1% d'azida sòdica (Sigma), durant 1h. Després de la incubació, la dilució d'anticòs primari es recuperava per a propers usos guardant-la a 4°C, podent ser reutilitzada pel fet de contenir azida sòdica. La membrana es rentava en 3 rentats de 15, 5 i 5min amb PBS-T i a continuació s'incubava durant 1h amb una dilució de l'anticòs secundari corresponent en PBS-T amb 0,1% d'albumina bovina sèrica. Els anticossos secundaris utilitzats foren contra IgG de conill o de ratolí (segons l'animal on s'havia obtingut l'anticòs primari emprat) marcats amb peroxidasa (Amersham Biosciences). Per acabar, es realitzaven 5 darrers rentats de 15, 5, 5, 5 i 5min de la membrana amb PBS-T.

Els anticossos primaris utilitzats van ser anti-c-Jun, anti-ciclina D1, anti-PCNA i anti-RAR $\beta$  (Santa Cruz Biotechnology), anti-c-Fos (BD Pharmingen), anti-c-Myc (BD Clontech) i anti-UCP1 (alpha-Diagnostic).

Detecció quimioluminiscent. La detecció per quimioluminescència es realitzava amb ECL (Amersham Biosciences) pipetejant el reactiu sobre la membrana varies vegades per assegurar l'arribada del substrat a totes les mostres per igual. La membrana es col·locava entre transparències eliminant l'excés de reactiu i s'exposava a un film fotogràfic (Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences) durant un temps òptim per obtenir senyal sense que aquest fos saturat. Les imatges de les bandes resultants es captaven per escaneig amb un densitòmetre Duoscan (Agfa) i posteriorment eren quantificades amb el programa *1D Image Analysis 3.5* (Kodak) en el cas de les proteïnes del cicle cel·lular o bé escanejades al Chemigenius amb el programa GeneSnap (Syngene) i quantificades amb el programa GeneTools (Syngene) en el cas de la proteïna UCP1.

## **6. Mesura de l'activitat COX**

La preparació de les mostres d'homogenat va ser com es descriu a l'apartat 4.3.

Per determinar l'activitat COX de les mostres de teixit adipós, es van realitzar mesures en el canvi d'absorbància a 550nm amb un espectrofotòmetre (Shimatzu) a 37°C. Els canvis en l'absorbància a aquesta longitud d'ona permeten mesurar l'activitat COX ja que són reflex de la transformació del citocrom c reduït al citocrom c oxidat, activitat duta a terme precisament per la proteïna COX. Per això, a la microcubeta de reacció s'hi mesclaven 70 $\mu$ l de ferrocitocrom c reduït 0,056mM, 100 $\mu$ l de tampó fosfat 0,01M pH7, una quantitat determinada de mostra



(variable segons la diferent activitat COX del teixit a mesurar) i aigua bidestil·lada fins a completar un volum final d'1ml en tots els casos.

El ferrocitocrom c reduït s'obtenia prèviament per diàlisi de ferrocitocrom c oxidat (Sigma) 0,8mM en tampó fosfat 0,001M pH7 amb àcid ascòrbic (Sigma) 0,05M.

La mesura de l'activitat COX es realitzava a les poques hores del sacrifici de l'animal mantenint sempre els homogenats en aigua-gel.

## **7. Determinació del contingut en lípids totals**

La determinació del contingut en lípids a mostres de teixit adipós es va dur a terme basant-se en el mètode prèviament descrit [32, 76] amb modificacions. Les mostres de teixit eren mesclades amb 1ml d'hexà:isopropanol (3:2 v/v) i els tubs gasejats amb nitrogen abans de tancar-los i protegits de la llum per prevenir l'oxidació dels lípids. Es deixaven en agitació orbital durant tot el vespre a temperatura ambient. El contingut dels tubs es passava a un altre tub que contenia 0,3ml de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,47M per eliminar contaminants no lipídics, es mesclava durant 5 minuts i es tornava a posar en agitació orbital durant 15 minuts. A continuació, els tubs eren centrifugats a 10000g i 4°C durant 10 minuts. El sobrenedant resultant era introduït dins un tub prèviament pesat al qual se li afegia hexà per dissoldre els lípids i a continuació es deixava eixugar per corrent de nitrogen. D'aquesta manera i per diferència de pesada es determinava el contingut en lípids del fragment de teixit inicial.

## **8. Anàlisi del contingut en BC per cromatografia líquida d'alta definició (HPLC)**

El contingut de BC i apocarotenals es va determinar a mostres de plasma i de pulmó per HPLC. Per a cada mostra de plasma o pulmó es determinaven aquests components en una sola injecció. Es va utilitzar acitretina com a control intern. La detecció i quantificació dels composts es va dur a terme amb llum visible i/o ultraviolada.

Aquestes determinacions van ser dutes a terme al laboratori *DMS Nutritional Products Ltd.* de Basel (Suïssa), com a resultat d'una col·laboració entre aquest laboratori i el nostre Laboratori de Biologia Molecular, Nutrició i Biotecnologia – Nutrigenòmica (LBNB) a la UIB.

## **9. Preparació de mostres per a tècniques de microscòpia òptica**

Mostres de diferents teixits frescs foren fixades durant tot el vespre en paraformaldehid al 4% en PB (*phosphate buffer* 0,1M, pH 7,4), netejades en el tampó fosfat, deshidratades en etanol de grau creixent (2 incubacions de 30min en etanol 75°, 2 incubacions de 70min en etanol 95°, 3 incubacions d'1h en etanol absolut) i xilè (2 incubacions d'1h). A continuació les mostres eren

incloses en parafina i s'estudiaven segons les tècniques següents.

### 9.1 Anàlisis morfològiques

Per a l'anàlisi morfològica es tenyiren amb hematoxilina i eosina seccions de mostres de 3µm de gruixa al cas de les mostres de pulmó o 5µm de gruixa al cas del teixit adipós.

Mostres de pulmó: per determinar possibles lesions als pulmons (com per exemple la presència de metaplàsia escamosa) dels animals d'estudi, es duqué a terme l'observació de mostres del lòbul superior del pulmó al microscopi òptic. Cada lòbul va ser dividit en dues zones. De cada animal s'analitzaren els 5 primers talls obtinguts per cada una de les dues zones en què fou dividit el lòbul del pulmó (10 talls en total), amb una distància de separació de 50µm entre un tall i el següent. A més també es visualitzaren altres 7 talls per cada una de les dues zones de lòbul (14 en total) distants 500µm entre ells.

Mostres de teixit adipós: mostres de diferents teixits adiposos foren tenyides amb hematoxilina-eosina i estudiades histològicament per avaluar la unilocularitat o multilocularitat dels adipòcits i el contingut en lípids.

Altres mostres: es van estudiar morfològicament alguns dels òrgans del tracte gastrointestinal per veure si s'havien vist afectats per BC, ja que aquest havia estat administrat per via oral.

Per al fetge es va examinar una secció per animal triada a l'atzar d'una determinada zona del lòbul esquerre.

Per a les mostres d'estomac, duodè i colon, es van examinar quatre talls diferents de cada animal per fer una anàlisi exhaustiva de les diferents zones d'aquests òrgans.

Algunes d'aquestes anàlisis van ser realitzades en col·laboració amb *l'Istituto di Morfologia Umana Normale* de la Universitat d'Ancona, Itàlia.

### 9.2 Anàlisis morfomètriques

Per a l'anàlisi morfomètrica dels diferents teixits adiposos s'utilitzaren les mateixes preparacions que per a les anàlisis morfològiques. Es digitalitzaren imatges del microscopi òptic i es va mesurar l'àrea de 100 cèl·lules uniloculars per secció com a mínim utilitzant un programari específic.

Algunes d'aquestes mostres es processaren en col·laboració amb *l'Istituto di Morfologia Umana Normale* de la Universitat d'Ancona, Itàlia i altres foren processades en la seva totalitat al nostre

laboratori (LBNB) a la UIB.

### 9.3 Vasculogènesi

Per estudiar la densitat de capil·lars al TAB inguinal, és a dir, el nombre de capil·lars per unitat d'àrea, es va mesurar la densitat de nuclis de cèl·lules endotelials i també l'àrea total ocupada per capil·lars a un augment de 100x a talls de teixit inclosos en resina de 2µm de gruixa prenent 10 zones de tres seccions diferents de TAB inguinal de cada un dels animals.

Aquesta tècnica fou duta a terme en col·laboració amb *l'Istituto di Morfologia Umana Normale* de la Universitat d'Ancona, Itàlia.

### 9.4 Immunohistoquímica

Es feren talls de 5µm que eren incubats en primer lloc amb un anticòs primari contra l'antigen a detectar diluït en PBS, després amb el corresponent anticòs secundari biotinilat, també diluït en PBS, i finalment amb el complex avidina-biotina amb peroxidasa (Vector). L'activitat peroxidasa es posava de manifest afegint el cromogen hidroclore de 3,3'-diaminobenzidina (Sigma) a les mostres com a substrat. A continuació els talls eren tenyits amb hematoxilina i muntats en Eukitt (Kindler).

Mostres de pulmó: s'estudiava la possible presència de metaplàsia escamosa als bronquíols. Per això, l'anticòs primari utilitzat va ser un anticòs monoclonal anti-pancitoqueratina (Sigma) diluït 1:50. L'anticòs secundari fou un anti-IgG de ratolí fabricat a cavall (Vector) diluït 1:200. L'especificitat del mètode es va provar fent incubacions paral·leles d'una sèrie de mostres sense l'anticòs primari (control negatiu). L'especificitat i funcionament de l'anticòs es va provar amb altres incubacions paral·leles de pell i placenta humanes, que contenen citoqueratina (control positiu).

Mostres de teixit adipós: en aquest cas es volia estudiar la presència o absència de la proteïna UCP1 al diferents teixits adiposos. Així, l'anticòs primari va ser un anticòs policlonal de conill anti-UCP1 (GeneTex) diluït 1:150 en PBS i l'anticòs secundari, un anticòs anti-IgG de conill biotinilat (Vector) diluït 1:200 en PBS. El control negatiu va ser igualment dut a terme amb incubacions paral·leles sense anticòs primari i com a control positiu es van utilitzar mostres de TAM interescapular de ratolí.

Aquesta tècnica, en el cas de les mostres de pulmó, fou duta a terme en col·laboració amb *l'Istituto di Morfologia Umana Normale* de la Universitat d'Ancona, Itàlia; les mostres de teixit adipós foren processades en la seva totalitat al nostre laboratori (LBNB) a la UIB.



