



UNIVERSITAT DE LES ILLES BALEARS

Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut

Grup de Metabolisme Energètic i Nutrició (GMEIN)

Las hormonas sexuales como moduladoras de la función mitocondrial y de la síntesis de adiponectina en el tejido adiposo blanco y en el músculo esquelético de rata

Tesis doctoral para optar al grado de

Doctora por la *Universitat de les Illes Balears*

Programa de Doctorado Interuniversitario en Nutrición Humana

Del *Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut*

Presentada por

Gabriela Capllonch Amer

Palma, mayo de 2014

Con el beneplácito de los directores:

Dr. Francisco José García-Palmer

Catedrático de Universidad

Dra. Magdalena Gianotti Bauzá

Catedrática de Universidad

Área de Bioquímica y Biología Molecular

Depto. Biología Fundamental y Ciencias de la Salud

La interesada

Gabriela Capllonch Amer

“...¿No podrían los científicos ser un poco más reduccionistas? Es como titular Anna Karenina algo así como ‘Donde una mujer abandona a su familia por otro hombre, siente una culpa y unos celos tremendos y se arroja al tren; incluye las dificultades de Levin, un hombre que busca y que al final encuentra a Dios’.

La ciencia necesita una inyección de arte.”

Lauren Groff, *Los monstruos de Templeton*

AGRADECIMIENTOS

Se dice que estás listo para graduarte de la licenciatura, cuando crees que lo sabes todo, que estás preparado para graduarte en un máster cuando ves que no sabes nada, y que puedes merecer el doctorado cuando te das cuenta de que nadie sabe nada de nada. Tras el arduo camino que todos conocemos, he llegado a ese punto, y quiero dar las gracias a todos los que lo han hecho posible.

En primer lugar, agradezco a mis directores de tesis el doctor Paco García-Palmer y la doctora Magdalena Gianotti su ayuda, sus consejos y su apoyo, que me han guiado a través del tortuoso camino de la ciencia. Quiero expresar también mi gratitud al resto de profesores del *Grup de Metabolisme Energètic i Nutrició*: a las doctoras Ana Proenza e Isabel Lladó por atender siempre a las llamadas de auxilio y subir a apagar el fuego, y a los doctores Pilar Roca y Jordi Oliver, que me han prestado ayuda siempre que la he necesitado.

A quienes me acogieron tan bien y me echaron una mano (o las dos) cuando llegué: Toñi, Antònia Nadal, Emi, Antonia, Adamo, Yolanda, Miki, Pere, Cati, Marilena. Moltes gràcies! Gracias también a Pep Miquel y a los oficiales de laboratorio por hacernos la vida un poco más fácil.

Un enorme gracias por supuesto a Jordi (que tants cops has estat el meu gurú), Miquelet (per tantes matinades, i pel teu constant bon humor), Miquelot (el meu company de final -casi-. Resulta que és vera que s'hi arriba!), Marco (por deshacer con calma todos los entuertos y animarme a menudo), Bel (vas arribar al moment just! Haguéssim tornat locos sense tu), Mercedes (el toque de glamour), Dani (la alegría de la huerta), M^a del Mar (les vegades que hem disfrutat d'un silenci -breu- al despatx plegades ;)). Mis compañeros de despacho, de penurias, de merendolas, de postres, de laboratorio, de gritos, de inundaciones, de apagones, de risas, de algún que otro mosqueo, de dudas, de pruebas, de estabulario... en fin, sin vosotros, esto no hubiera sido lo

mismo! No quiero dejar de mencionar a Ileana, que contagia su alegría y te anima hasta en los peores días. Eres un ejemplo a seguir 😊

A la artista de la portada Elena Palmer, gracias por hacerlo tan bien!

Y finalmente, gracias a todos los que me habéis ayudado, animado, apoyado y aguantado en estos años. Sé que todos os reconoceréis en este agradecimiento: ¡brindo por la familia y por los buenos amigos, y por los finales que son un comienzo!

Gabriela

Este trabajo ha sido posible gracias a los proyectos de investigación financiados por la Dirección General de Investigación y Gestión del Plan Nacional de I+D+i (SAF2010-21792), por el Fondo de Investigaciones Sanitarias (PI060293) del Gobierno Español, y por ayudas de la Comunidad Autónoma de las Islas Baleares y FEDER (31/2011 y AAEE002/2012). La doctoranda recibió una subvención de la Conselleria d'Educació, Cultura i Universitats del Goven de les Illes Balears tras ser seleccionada en el marco de un programa cofinanciado por el Fondo Social Europeo.


Govern de les Illes Balears
Conselleria d'Educació, Cultura i Universitats
Direcció General d'Ordenació,
Innovació i Formació Professional



Invertim en el seu futur

Unió Europea
Fons Social Europeu

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ABREVIATURAS	v
RESUMEN	xi
1. Introducción	1
1.1. FUNCIÓN Y BIOGÉNESIS MITOCONDRIALES.....	3
1.1.1. El genoma mitocondrial.....	4
1.1.2. Regulación de la transcripción del genoma mitocondrial.....	5
1.1.3. Regulación de la replicación del genoma mitocondrial.....	7
1.1.4. Expresión coordinada de factores nucleares y mitocondriales.....	8
1.1.5. Dinámica mitocondrial.....	13
1.1.6. Disfunción mitocondrial.....	15
1.1.7. Dimorfismo sexual en la función y dinámica mitocondrial	18
1.2. EL TEJIDO ADIPOSO BLANCO COMO ÓRGANO ENDOCRINO.....	22
1.2.1. La adiponectina, una adipoquina multifuncional.....	25
1.2.2. Influencia de las hormonas sexuales en el metabolismo del tejido adiposo	28
1.2.3. Tiazolidinedionas	30
1.3. EL MÚSCULO ESQUELÉTICO: DIANA DE LA ADIPONECTINA.....	33
1.3.1. Disfunción mitocondrial en el músculo esquelético. Relación con la resistencia a la insulina.....	34
1.3.2. Papel de la adiponectina en el músculo esquelético.	36
2. Objetivos y planteamiento experimental	39
3. Materiales y métodos	49
3.1. ESTUDIOS <i>IN VIVO</i>	51
3.1.1. Animales y tratamientos	51
3.1.2. Sacrificio y obtención de las muestras	52
3.1.3. Determinación de parámetros circulantes	53
3.1.4. Procesamiento de las muestras.....	53
3.2. ESTUDIOS <i>IN VITRO</i>	57

3.2.1. Modelos de estudio <i>in vitro</i> utilizados	57
3.2.2. Materiales.....	58
3.2.3. Protocolo de mantenimiento y diferenciación de adipocitos 3T3-L158	
3.2.4. Protocolo de mantenimiento y diferenciación de miocitos L6E9	59
3.2.5. Tratamientos	60
3.2.6. Procedimientos generales de cultivos celulares.....	60
3.2.7. Recogida de las células y procesamiento	62
3.2.8. Análisis de la viabilidad celular	63
3.3. METODOLOGÍA GENERAL	64
3.3.1. Determinación del consumo de oxígeno de las miofibras permeabilizadas	64
3.3.2. Determinación de la producción de radicales libres en las miofibras permeabilizadas	64
3.3.3. Determinación de la composición tisular	66
3.3.3.1 Proteínas	66
3.3.3.2 Ácido desoxirribonucleico	68
3.3.3.3 Triglicéridos	69
3.3.4. Test de tolerancia a la glucosa	70
3.3.5. Determinación del contenido de cardioplipina	70
3.3.6. Determinación semicuantitativa de los niveles de proteínas. Western blot.....	71
3.3.7. Determinación del daño oxidativo	73
3.3.8. Medida de la expresión génica.....	75
3.3.9. Actividades enzimáticas.....	80
3.3.9.1. Citrato sintasa.....	80
3.3.9.2. Citocromo c oxidasa.....	81
3.3.9.3. Glutación peroxidasa	83
3.3.9.4. Superóxido dismutasa	84
3.3.10. Estudio microscópico mediante análisis confocal.....	80
3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	87
3.4.1. Análisis estadístico en los estudios <i>in vivo</i>	80
3.4.2. Análisis estadístico en los estudios <i>in vitro</i>	80

4. Resultados y discusión	89
4.1. EFECTO DE LAS HORMONAS SEXUALES SOBRE LA BIOGÉNESIS MITOCONDRIAL Y LA SÍNTESIS DE ADIPONECTINA EN ADIPOCITOS BLANCOS	91
4.1.1. Resultados	91
4.1.2. Discusión	102
4.2. EFECTO DEL ESTRADIOL SOBRE LA BIOGÉNESIS MITOCONDRIAL Y LA EXPRESIÓN DE ADIPONECTINA EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO	107
4.2.1. Resultados	107
4.2.2. Discusión	117
4.3. DIMORFISMO SEXUAL EN EL EFECTO DE LA ROSIGLITAZONA SOBRE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL Y LA SÍNTESIS DE ADIPONECTINA DEL TEJIDO ADIPOSO BLANCO GONADAL DE RATA	124
4.3.1. Resultados	124
4.3.2. Discusión	137
5. Recapitulación	139
6. Conclusiones	149
7. Referencias bibliográficas	153
8. Relación de tablas y figuras	177
8.1. RELACIÓN DE TABLAS	179
8.2. RELACIÓN DE FIGURAS	181

ABREVIATURAS

Ac	Anticuerpo
ACC	Acil coenzima A sintetasa
AcCoA	Acetil CoenzimaA
AdipoR	Receptor de adiponectina / <i>Adiponectin receptor</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ADNmt	ADN mitocondrial
ADP	Adenosina difosfato
ALBP/aP2	Proteína adipocítica de unión a lípidos aP2/ <i>Adipocyte lipid binding protein aP2</i>
AMP	Adenosina monofosfato
AMPK	Proteína quinasa dependiente de adenosina monofosfato
APPL1	Proteína adaptadora con un dominio PH, PTB y motivo de cremallera de leucina 1 / <i>Adaptor protein containing PH domain, PTB domain and leucine zipper motif 1</i>
AR	Receptor de andrógenos / <i>Androgen receptor</i>
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARNr	ARN ribosómico
ARNt	ARN de transferencia
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albúmina de suero bovino / <i>Bovine Serum Albumine</i>
COX	Citocromo c oxidasa / <i>Cytochrome c oxidase</i>
COX2	Subunidad 2 de la citocromo c oxidasa / <i>Cytochrome c oxidase subunit 2</i>
COX4	Subunidad 4 de la citocromo c oxidasa / <i>Cytochrome c oxidase subunit 4</i>

CPT	Carnitina palmitoil transferasa / <i>Carnitin Palmitoyl Transferase</i>
CS	Citrato Sintasa / <i>Citrate Synthase</i>
D.O.	Densidad óptica
DAB	Diaminobenzidina tetrahidrocloride
DABA	Ácido diaminobenzoico
DAP	Dihidroxiacetona fosfato
DMEM	Medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco / <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazina
dNTP	Dinucleótido trifosfato
Drp1	Proteína relacionada con la dinamina 1 / <i>Dynamain-related protein 1</i>
DTNB	Ácido dinitrobenzoico
DTT	Ditiotreitol
E2	17beta-estradiol
EGTA	Etilenglicol del ácido tetraacético
ELISA	Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas / <i>Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay</i>
ER	Receptor de estrógenos / <i>Estrogen receptor</i>
EREs	Elementos de respuesta a estrógenos / <i>Estrogen Response Elements</i>
EtOH	Etanol
FADH2	Dinucleótido de adenilflavina reducido
FBS	Suero bovino fetal / <i>Fetal Bovine Serum</i>
Fis1	Proteína de fisión 1 / <i>Fission protein 1</i>
G3P	Glicerol-3-fosfato
GK	Glicerol quinasa
GLUT4	Transportador de glucosa 4

GPx	Glutación peroxidasa
GRd	Glutación reductasa
GSH	Glutación
GSSG	Glutación oxidado
GuHCl	Guanidina hidrocioruro
HFD	Dieta rica en lípidos y sacarosa / <i>High fat high sucrose diet</i>
HMG	Grupo de elevada movilidad / <i>High Mobility Group</i>
HMW Ad	Adiponectina de elevado peso molecular / <i>High Molecular Weight adiponectin</i>
HNE	4-hidroxi-2-nonenal
HOMA-IR	Modelo de evaluación de la homeostasis para estimar la resistencia a la insulina
HRP	Peroxidasa de rábano / <i>Horseradish peroxidase</i>
HSP	Promotor de la cadena pesada / <i>Heavy Strand Promoter</i>
IBMX	Isobutil metil xantina
IgG	Inmunoglobulina G
IL-6	Interleuquina 6
IRS	Sustrato del receptor de insulina / <i>Insulin receptor substrate</i>
K-MES	Potasio metanelsulfonato
LMW Ad	Adiponectina de bajo peso molecular / <i>Low Molecular Weight adiponectin</i>
LPL	Lipoproteína lipasa
LSP	Promotor de la cadena ligera / <i>Light Strand Promoter</i>
MetOH	Metanol
Mfn1	Mitofusina 1 / <i>Mitofusin 1</i>
Mfn2	Mitofusina 2 / <i>Mitofusin 2</i>
MMW Ad	Adiponectina de peso molecular intermedio / <i>Medium Molecular Weight adiponectin</i>

mTERF	Factor mitocondrial de terminación de la transcripción
MTG	Mitotracker green
MuLV	<i>Murine Leukemia Virus</i>
NAD ⁺	Nicotinamida adeninda dinucleótido oxidado
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
NADP ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótico fosfato oxidado
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
NRF	Factor de respiración nuclear / <i>Nuclear Respiratory Factor</i>
NTF	Factor de transcripción nuclear / <i>Nuclear Transcription Factor</i>
o/n	Toda la noche / <i>Over night</i>
Opa1	Proteína de atrofia óptica 1 / <i>Optic Atrophy 1</i>
OVX	Ovariectomizadas
OXPHOS	Cadena de fosforilación oxidativa
Pg	Progesterona
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida / <i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
PBS	Tampón fosfato salino / <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PBS-T	Tampón fosfato salino suplementado con Tween-20
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PGC1 α	Coactivador 1 alfa del PPAR gamma / <i>PPAR gamma coactivator 1 alpha</i>
PI3K	Proteína quinasa 3 de fosfoinosítidos
PIP3	Fosfoinositol trifosfato
PKB	Proteína quinasa B
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
POLRMT	ARN polimerasa mitocondrial
PPAR γ	Receptor activado por proliferadores peroxisomales gamma / <i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>

P-S	Penicilina-estreptomina
RBP 4	Proteína de unión al retinol 4 / <i>Retinol Bindin Protein 4</i>
ROS	Especies reactivas de oxígeno / <i>Reactive Oxygen Species</i>
Rsg	Rosiglitazona
RT	Temperatura ambiente / <i>Room Temperature</i>
RXR	Receptor X de retinoides
SDS	Dodecilsulfato sódico
SOD	Superóxido dismutasa
T	Testosterona
TAB	Tejido adiposo blanco
TAG	Triacilglicéridos
TAM	Tejido adiposo marrón
TBS	Tampón Tris salino / <i>Tris Buffered Saline</i>
TBS-T	Tampón Tris salino suplementado con Tween-20
TFAM	Factor de transcripción mitocondrial A
TFB1M	Factor de transcripción mitocondrial B1
TFB2M	Factor de transcripción mitocondrial B2
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa / <i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>
TZD	Tiazolidinediona
UCP	Proteína desacoplante / <i>Uncoupling protein</i>
XOD	Xantina oxidasa



Las hormonas sexuales como moduladoras de la función mitocondrial y de la síntesis de adiponectina en el tejido adiposo blanco y en el músculo esquelético de rata

Tesis doctoral, Gabriela Capllonch Amer, *Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut, Universitat de les Illes Balears*, Palma, España

RESUMEN

Diversos estudios han puesto de manifiesto la existencia de un dimorfismo sexual en la función mitocondrial de varios tejidos, incluyendo el tejido adiposo blanco (TAB) y el músculo esquelético, de modo que las ratas hembra presentan mitocondrias más funcionales que los machos. Además, las hembras muestran una mayor expresión de adiponectina (una adipocina insulino-sensibilizante) lo que se traduce en un mejor perfil de sensibilidad a la insulina, incluso bajo estímulos dietéticos obesogénicos inductores de disfunción mitocondrial y resistencia a la insulina.

El objetivo principal de la presente tesis ha sido la caracterización de los efectos de las hormonas sexuales sobre la función mitocondrial del TAB y del músculo esquelético, así como su relación con la síntesis de adiponectina en ambos tejidos. Se ha pretendido, además, estudiar si el dimorfismo sexual previamente descrito se extiende a la modulación de los efectos del fármaco antidiabético rosiglitazona (Rsg). Para la consecución de estos objetivos se ha trabajado simultáneamente en modelos *in vitro* con adipocitos 3T3-L1 y miocitos L6E9 e *in vivo* con ratas Wistar de ambos sexos sometidas a una dieta hiperlipídica rica en sacarosa y tratadas con Rsg, y con hembras ovariectomizadas suplementadas con 17beta-estradiol (E2).

Los resultados obtenidos en el estudio del músculo esquelético de las ratas ovariectomizadas muestran que estas presentan una disminución de los marcadores de la función mitocondrial y de la expresión de adiponectina muscular que se recuperan en gran parte con la suplementación de E2. Este efecto estimulador del E2 sobre la función mitocondrial y la expresión de adiponectina se confirma en los experimentos realizados tanto en adipocitos 3T3-L1 como en miotubos L6E9. Además, en el músculo esquelético el E2 no solo estimula la expresión de la adiponectina, sino también la sensibilidad del tejido a esta adipoquina. El E2 parece ejercer también un efecto reequilibrador que contrarrestaría estímulos negativos para la función mitocondrial y la síntesis de adiponectina en los adipocitos blancos, de modo que sus efectos serían más relevantes en condiciones que impliquen disfunción mitocondrial. Por su parte, la testosterona (T) ejerce efectos opuestos a los descritos para el E2 tanto en miotubos como en adipocitos. Estos efectos del E2 como los de la T explicarían las diferencias previamente observadas entre machos y hembras.

Los resultados obtenidos en animales sometidos a una dieta rica en grasas y sacarosa muestran que la Rsg estimula la biogénesis mitocondrial tanto en el TAB gonadal periovárico como en el epididimal. Sin embargo, dicha estimulación es mayor en las hembras, perfil que se repite al analizar la síntesis de adiponectina. Estos resultados refuerzan la idea de que la función mitocondrial sería uno de los factores que pueden condicionar la expresión de la adiponectina, e indican que dicha relación se mantiene en presencia de fármacos como la Rsg.

En conjunto, los resultados de esta tesis ponen de manifiesto que la respuesta de la función mitocondrial a las hormonas sexuales es muy similar en el TAB y en el músculo esquelético. Además, el paralelismo entre funcionalidad mitocondrial y síntesis de adiponectina en estos tejidos refuerza la hipótesis de la existencia de un eje adipo-muscular conectado a través de la adiponectina y modulado, al menos en parte, por las hormonas sexuales.



Introducción

1.1. FUNCIÓN Y BIOGÉNESIS MITOCONDRIALES

Las mitocondrias son orgánulos presentes en el citoplasma de las células eucariotas cuya misión principal es la producción de energía a través de la fosforilación oxidativa. El tamaño, la forma, la abundancia y la capacidad funcional de las mitocondrias puede verse modificada para adaptarse a situaciones de mayor demanda energética, así como frente a diferentes condiciones fisiológicas o ambientales (Goffart y Wiesner 2003). Esta adaptación es posible gracias al proceso denominado biogénesis mitocondrial, término que engloba tanto la proliferación como la diferenciación mitocondrial (Fernández-Silva, et al. 2003; Garesse y Vallejo 2001). La proliferación consiste en el aumento del número de mitocondrias por célula y la diferenciación, en el aumento de las capacidades funcionales de las mitocondrias preexistentes, de modo que la diferenciación es el proceso mediante el cual el orgánulo adquiere las características estructurales y funcionales adecuadas para el desarrollo de las funciones específicas de las distintas células del organismo (Nisoli, et al. 2004).

Durante las últimas décadas, la investigación sobre la función y biogénesis de la mitocondria está experimentando un nuevo apogeo debido a la relación que se ha observado entre alteraciones en su funcionalidad y la progresión de patologías como la diabetes, neoplasias o algunas enfermedades neurodegenerativas (Wallace 1999). En el control de dicha biogénesis mitocondrial participan numerosos procesos como la regulación de la expresión y la replicación del genoma mitocondrial, la expresión y el transporte a la mitocondria de diversas proteínas codificadas por genes nucleares. Todos estos sucesos son regulados y coordinados por una serie de proteínas clave que se describirán a continuación y que podemos separar en: factores reguladores de la transcripción mitocondrial, reguladores nucleares de

la expresión de genes relacionados con la función mitocondrial y coactivadores transcripcionales.

1.1.1. El genoma mitocondrial

Cada mitocondria contiene entre 2 y 10 moléculas de ADN mitocondrial (ADNmt) que codifican para un conjunto de polipéptidos esencial para el funcionamiento de la cadena respiratoria mitocondrial (Attardi y Schatz 1988; Fernández-Silva et al. 2003). Esta molécula presenta una serie de peculiaridades en cuanto a la organización de la información genética: muy pocos espacios entre genes, ausencia de intrones, genes superpuestos y un código genético que difiere del universal (Clayton 2000).

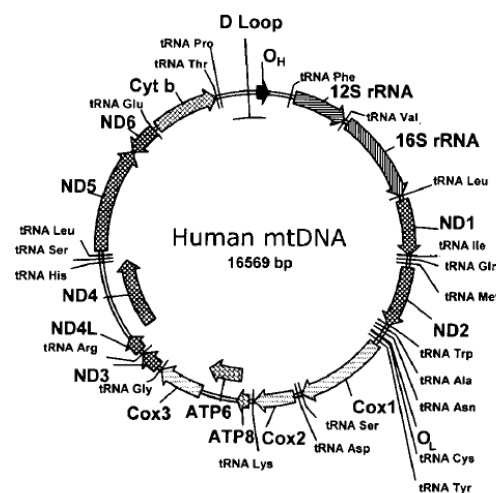


Figura 1.- Mapa del ADN mitocondrial humano. Extraído de Alexeyev et al. 2004.

El ADNmt es una molécula circular de doble cadena de aproximadamente 16.6kb en vertebrados organizada en nucleoides (Miyakawa, et al. 1984) (Figura 1). Las dos cadenas difieren en su composición de nucleótidos de guanina y timina, y se denominan hebra ligera (L) y hebra pesada (H). La principal región no codificante de la molécula, la región *D-loop*, contiene el origen de replicación de la cadena pesada (O_H) y los promotores transcripcionales de ambas hebras (LSP *-light strand promoter-* y HSP *-heavy*

strand promoter-) (Shadel y Clayton 1997). El origen de replicación de la cadena ligera (O_L) está situado en otra región no codificante de la molécula a dos tercios de distancia de O_H .

El genoma mitocondrial de mamíferos está formado por 37 genes, trece de los cuales codifican para proteínas de la cadena respiratoria mitocondrial, concretamente para subunidades constituyentes del sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS). Los 24 genes restantes codifican para dos ARN ribosómicos (ARNr) y veintidós ARN de transferencia (ARNt) esenciales para la traducción del ADNmt (Garesse y Vallejo 2001). El resto de las proteínas integrantes del sistema OXPHOS así como las proteínas involucradas en el metabolismo mitocondrial se sintetizan en el citoplasma a partir del genoma nuclear y son importadas a la mitocondria. Es por ello que la correcta funcionalidad de las mitocondrias depende de una comunicación precisa entre ambos genomas (Garesse y Vallejo 2001).

1.1.2. Regulación de la transcripción del genoma mitocondrial

El genoma mitocondrial se transcribe completamente a partir de los promotores HSP y LSP generando dos ARN mensajeros (ARNm), uno por cada hebra (Aloni y Attardi 1971; Murphy, et al. 1975). La iniciación de la transcripción requiere de la actividad de una ARN polimerasa específica del orgánulo (POLRMT) (Tiranti, et al. 1997) y de al menos tres factores de transcripción: para la iniciación el factor de transcripción mitocondrial A (TFAM, *mitochondrial transcription factor A*) (Fisher y Clayton 1985) y el factor de transcripción mitocondrial B1 o B2 (TFBM, *mitochondrial transcription factor B*) (Falkenberg, et al. 2002), y para la terminación el factor mitocondrial de terminación de la transcripción (MTERF, *mitochondrial transcription termination factor*) (Daga, et al. 1993) (Figura 2).

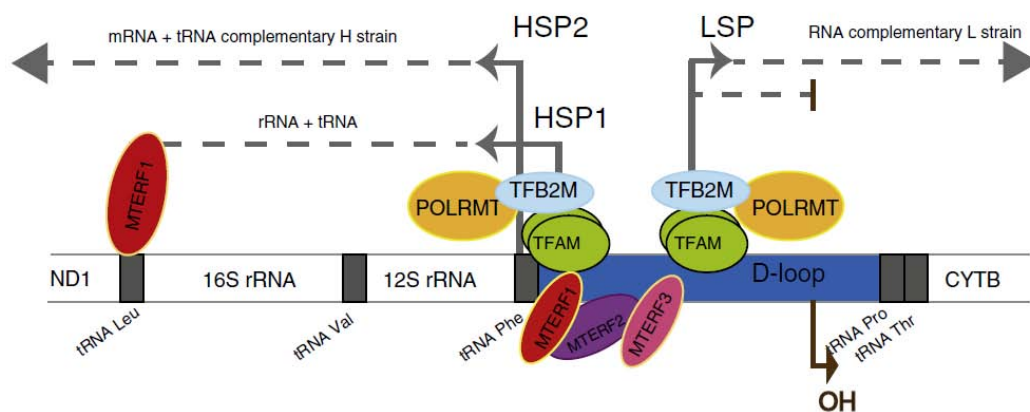


Figura 2.- Modelo de la maquinaria de transcripción del ADN mitocondrial.

Extraído de Peralta et al. 2012.

El TFAM es una proteína perteneciente a la familia de las proteínas de elevada movilidad (HMG, *high mobility group*) que, al igual que otras proteínas del grupo, posee la capacidad de envolver, doblar y desenrollar el ADN (Fisher, et al. 1992; Parisi y Clayton 1991). Este factor interacciona con el promotor de cada una de las hebras a través de sus dominios HMG-box, estimulando la transcripción mediante la facilitación de la unión de la ARN polimerasa (Shadel y Clayton 1997). Para que comience la transcripción del ADNmt, es necesario que un heterodímero formado por un TFB2M y la POLRMT interaccione con el TFAM previamente unido a la secuencia del promotor, de modo que los TFB2M actúan como puente entre el TFAM y la POLRMT, facilitando el acercamiento de la ARN polimerasa al promotor (McCulloch y Shadel 2003).

Los lugares de unión del TFAM están secuencia arriba de los dos puntos de iniciación más activos del *D-loop* (H_1 y L), pero tanto la unión como la estimulación de la transcripción son mayores para el LSP que para el HSP (Ghivizzani, et al. 1994). De este modo, bajos niveles de TFAM son suficientes para que se transcriba la hebra ligera, cuyos productos son necesarios para la replicación del ADNmt (Clayton 1992). Por otra parte, son

necesarios elevados niveles de TFAM para que este se pueda unir a HSP y estimular la transcripción de la hebra pesada, cuyos productos codifican para proteínas mitocondriales (Dairaghi, et al. 1995). El TFAM también ha sido descrito como un elemento estabilizador del cromosoma mitocondrial a través de su unión inespecífica a secuencias no promotoras (Alam, et al. 2003; Takamatsu, et al. 2002).

Para la terminación de la transcripción se precisan las proteínas MTERFs. Aunque inicialmente se propuso que estas participaban en la terminación como una mera barrera física a través de la unión a las regiones TERM (Rebelo, et al. 2009), hay evidencias de que su papel implica también la interacción con la ARN polimerasa (Fernández-Silva et al. 2003).

1.1.3. Regulación de la replicación del genoma mitocondrial

La replicación del ADNmt se da principalmente en la última parte de la fase S y la fase G₂ del ciclo celular de forma independiente a la replicación del ADN nuclear (Bogenhagen y Clayton 1977). El modelo actualmente aceptado propone que la síntesis empezaría en O_H, localizado corriente abajo del LSP en la región *D-loop*, a partir de donde la ADN polimerasa mitocondrial (ADNpoly) avanzaría a lo largo de la cadena ligera generando una cadena pesada circular hija. Al alcanzar O_L, la hebra H parental es desplazada de modo que O_L queda expuesto y comienza la replicación de la hebra L (Shadel y Clayton 1997).

Para que pueda dar comienzo la replicación son necesarias pequeñas moléculas de ARN que actúan como cebadores y que se generan a partir del procesamiento del ARN precursor derivado de la transcripción de la cadena ligera (Moraes 2001). Por tanto, transcripción y replicación del ADNmt están interconectados, de modo que los factores reguladores controlan ambos procesos (Fernández-Silva et al. 2003).

La replicación del ADNmt no se da siempre en paralelo al crecimiento y división de estos orgánulos (Shadel y Clayton 1997), por lo que no se puede asociar simplemente con la proliferación. En condiciones fisiológicas, el número de copias de ADNmt varía entre células y tejidos, pero se mantiene dentro de un rango, y se replica con cada ciclo celular (Moraes 2001). Sin embargo, cuando se alteran las condiciones fisiológicas, el número de copias de ADNmt se modula para adaptarse a los nuevos requerimientos (Renis, et al. 1989; Shay, et al. 1990; Wiesner, et al. 1992; Williams, et al. 1986). Es un hecho que la cantidad de ADNmt se ve alterada en células y tejidos en patologías como el cáncer (Yu 2011) y en enfermedades metabólicas como la obesidad y la diabetes (Kaaman, et al. 2007; Lee, et al. 1998; Lindinger, et al. 2010). Ahora bien, los resultados obtenidos son controvertidos y en ocasiones contradictorios, y los métodos empleados para las cuantificaciones tienen aún importantes limitaciones, por lo que el significado de estas alteraciones no ha sido aún definido con exactitud (Malik y Czajka 2012).

1.1.4. Expresión coordinada de factores nucleares y mitocondriales

La participación del genoma nuclear y del mitocondrial en la síntesis de las proteínas mitocondriales supone una elevada complejidad del proceso de biogénesis mitocondrial (Fernández-Silva et al. 2003; Scarpulla 2002b; Shadel y Clayton 1997).

La regulación coordinada de la expresión de ambos genomas se logra a través de la acción de factores nucleares, que se diferencian en dos clases en función de su mecanismo de acción: factores codificados a nivel nuclear que participan en la expresión génica mitocondrial (POLRMT, TFAM, TFBMs, MTERF) y factores que gobiernan la expresión de genes nucleares que codifican para proteínas mitocondriales. Estos últimos pueden a su vez ser factores de transcripción que se unen directamente a promotores del ADN nuclear para activar la transcripción de genes específicos, o bien coactivadores

transcripcionales que no se unen específicamente al ADN pero que también modulan la transcripción de genes relacionados con la función mitocondrial (Scarpulla 2002a, 2002b, 2006). Los principales factores de la red transcripcional que controla la biogénesis mitocondrial están esquematizados en la Figura 3.

Factores de transcripción: factores nucleares de respiración y superfamilia de receptores nucleares

Los factores nucleares de respiración, NRF1 y NRF2 (*nuclear respiratory factors*), fueron los primeros factores de transcripción implicados en la expresión de funciones mitocondriales en vertebrados.

El NRF1 se une al ADN en forma de homodímero (Virbasius, et al. 1993a) y presenta un dominio carboxi-terminal que le confiere las propiedades de activador transcripcional (Gugneja, et al. 1996). Este factor está involucrado en la regulación de la expresión de genes nucleares que codifican para los cinco complejos de la cadena respiratoria, además de otros implicados en su ensamblaje (Kelly y Scarpulla 2004; Scarpulla 2002b). Además, el NRF1 también puede regular la expresión de genes nucleares implicados en la transcripción mitocondrial como el TFAM (Scarpulla 2011), TFB1M, TFB2M (Gleyzer, et al. 2005) y POLRMT. De este modo, el NRF1 integra la comunicación núcleo-mitocondrial. Se ha visto también que NRF1 activa genes implicados en procesos de reparación del ADN, proliferación celular, migración y apoptosis (Cam, et al. 2004), por lo que constituye un punto de integración de la respiración mitocondrial con otros procesos celulares.

Por su parte, el NRF2, también conocido como GABP (*GA binding protein*), es un factor de múltiples subunidades. La subunidad α presenta el dominio de unión al ADN, y el resto de subunidades (β_1 , β_2 , γ_1 , γ_2) aportan el dominio de activación transcripcional y modulan la afinidad de la unión (Virbasius, et al.

1993b). Se han identificado dominios de unión del NRF2 en genes del sistema OXPHOS (subunidades de los complejos II y IV) así como en otros genes relacionados con la expresión de proteínas de la cadena respiratoria (Scarpulla 2006). Además, este factor es un mediador clave de la respuesta antioxidante (Li y Kong 2009) y, al igual que el NRF1, regula la expresión de TFAM, los TFBMs y MTERF (Scarpulla 2006).

Otros factores que juegan también un papel central en el control transcripcional de genes nucleares codificantes de proteínas mitocondriales son algunos miembros de la superfamilia de receptores nucleares, principalmente los receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPARs, *peroxisome proliferator-activated receptors*) (Puigserver, et al. 1998) y el receptor de estrógenos (Tcherepanova, et al. 2000). La interacción con estos receptores es la forma mediante la que actúan sobre la expresión génica pequeñas hormonas lipofílicas como las hormonas esteroideas o tiroideas, o algunas vitaminas.

Los receptores nucleares actúan uniéndose a secuencias cortas de la región reguladora de los genes diana denominadas elementos de respuesta a hormonas (HRE, *hormone response elements*). Los efectos transcripcionales de los receptores nucleares están mediados por el reclutamiento de coactivadores y co-represores (Gronemeyer, et al. 2004). En ausencia de ligando algunos receptores nucleares pueden actuar como represores transcripcionales, debido a su asociación con co-represores que se encuentran en complejos que contienen desacetilasas de histonas y causan compactación de la cromatina y represión transcripcional. Tras la unión del ligando los receptores sufren un cambio conformacional que produce la liberación de los co-represores y permite el reclutamiento secuencial de diferentes complejos de coactivadores (Rosenfeld, et al. 2006). Entre los coactivadores se encuentran complejos remodeladores de la cromatina dependientes de ATP y complejos con

actividad acetiltransferasa que inducen una descompactación de la cromatina, permitiendo de este modo la unión de la maquinaria basal de la transcripción, así como de complejos que provocan el reclutamiento de la ARN polimerasa II al promotor, permitiendo la transcripción del gen diana. Tanto los receptores como los coactivadores y los co-represores pueden sufrir modificaciones post-transcripcionales que modulen su actividad.

Coactivadores transcripcionales: familia de coactivadores del PGC1

Entre los integrantes de la familia de coactivadores del PPAR gamma (PGC) cabe destacar el PGC1 α (*PPAR γ coactivator 1 alpha*), que regula la expresión de subunidades de la cadena respiratoria mitocondrial y la del TFAM. Este cofactor ha sido puesto de relieve como punto clave de la regulación de la biogénesis mitocondrial frente a múltiples situaciones fisiopatológicas, actuando como nexo entre los estímulos externos y los cambios en la función mitocondrial (Arany, et al. 2005; Garnier, et al. 2003; Lehman, et al. 2000; Leone, et al. 2005). El PGC1 α exhibe un patrón de expresión tisular muy específico y es altamente inducible a nivel transcripcional (Lin, et al. 2005). De este modo, los tejidos con sistemas mitocondriales muy desarrollados, como el músculo, el riñón o el tejido adiposo marrón (TAM) presentan una expresión elevada de PGC1 α inducida en gran medida como respuesta a un aumento de la demanda energética condicionada por alteraciones como el frío, el ejercicio o el ayuno (Puigserver y Spiegelman 2003; Terada, et al. 2005; Wu, et al. 1999). Estos hechos convierten al PGC1 α en el punto central de la coordinación de múltiples procesos celulares implicados en el metabolismo energético.

El PGC1 α carece de un dominio de unión al ADN, por tanto ejerce su control mediante la interacción con numerosos factores de transcripción, como los NRFs del promotor del TFAM (Wu et al. 1999). La fuerte inducción de NRF1 y NRF2 es la señal mediante la que el PGC1 α estimula la biogénesis

mitocondrial, aumentando los niveles de TFAM, el cual se unirá al ADN promoviendo la transcripción y replicación del ADNmt

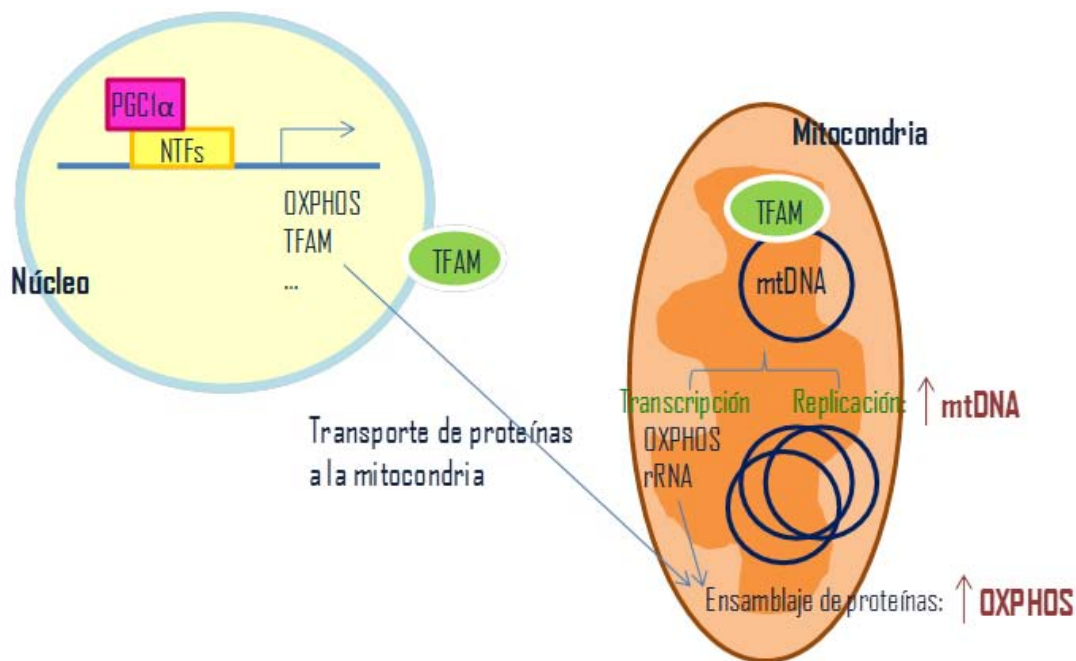


Figura 3.- Representación esquemática de los principales factores de la red transcripcional que controla la biogénesis mitocondrial. Modificado de Ventura-Clapier et al. 2008. PGC-1 α , coactivador 1 alfa del receptor activado por proliferadores peroxisomales gamma; NTFs, factores de transcripción nucleares; Tfam, factor de transcripción mitocondrial A; mtDNA, ADN mitocondrial; OXPHOS, fosforilación oxidativa

Otro miembro de esta familia es PGC1 β , un homólogo de PGC1 α (Lin, et al. 2003) que actúa también induciendo la expresión de genes mitocondriales. Al contrario que el PGC1 α , PGC1 β parece no alterarse frente a cambios metabólicos como el ejercicio, el ayuno o el frío, sugiriendo que este coactivador juega un papel en la biogénesis mitocondrial constitutiva (Meirhaeghe, et al. 2003). Sin embargo, recientemente se ha descubierto que algunos fármacos, como la rosiglitazona, median su efecto sobre la biogénesis mitocondrial a través del PGC1 β y no del PGC1 α (Pardo, et al. 2011).

1.1.5. Dinámica mitocondrial

En los últimos años, el concepto de mitocondria como sistema individualizado y estático ha quedado obsoleto, y las mitocondrias se han revelado como un sistema dinámico e interactivo (Bereiter-Hahn y Voth 1994). En consecuencia se ha desarrollado el concepto de dinámica mitocondrial, entendida como el movimiento de las mitocondrias a través de la célula así como la regulación de la morfología y distribución mitocondrial.

La dinámica mitocondrial está controlada por dos procesos: fisión y fusión (Figura 4). El balance entre la fusión y la fisión regula la función mitocondrial permitiendo el reclutamiento de mitocondrias a subcompartimentos celulares determinados, cambios en la morfología mitocondrial, intercambio de contenido entre mitocondrias, comunicación de las mitocondrias con el citosol y control de calidad mitocondrial (Liesa, et al. 2009; Twig, et al. 2008). Como resultado, la mitocondria se puede adaptar rápidamente a cambios en los requerimientos celulares.

Fusión mitocondrial

La fusión genera túbulos elongados e interconectados de mitocondrias, de forma que promueve la cooperación entre las mitocondrias, protegiéndolas de sufrir disfunciones respiratorias (Chen, et al. 2003), y posibilitando la mezcla intermitocondrial de ADNmt, lo que supone un mecanismo de control frente a posibles mutaciones (Nakada, et al. 2009).

Las principales proteínas implicadas en la fusión son las mitofusinas (Mfn1, Mfn2) y la proteína de atrofia óptica 1 (Opa1, *optic atrophy 1*), todas ellas GTPasas. Las mitofusinas se localizan en la membrana externa mitocondrial, mientras que Opa1 es una proteína intermembrana íntimamente asociada con la membrana interna. A partir de estas observaciones se ha establecido que las mitofusinas rigen la fusión de la membrana externa mitocondrial y que Opa1

lo hace de la membrana interna en pasos separados pero coordinados. La fusión regida por Opa1 y su regulación se proponen como el paso limitante del proceso de fusión (Liesa et al. 2009). La estimulación de la fusión por Opa1 es dependiente de Mfn1 (Cipolat, et al. 2004), pero no se han detectado aún interacciones bioquímicas entre las mitofusinas y Opa1 en células de mamíferos. Mfn1 y Mfn2 pueden actuar como oligómeros homotrópicos o heterotrópicos, es decir, pueden cooperar o actuar individualmente para promover la fusión (Chen et al. 2003).

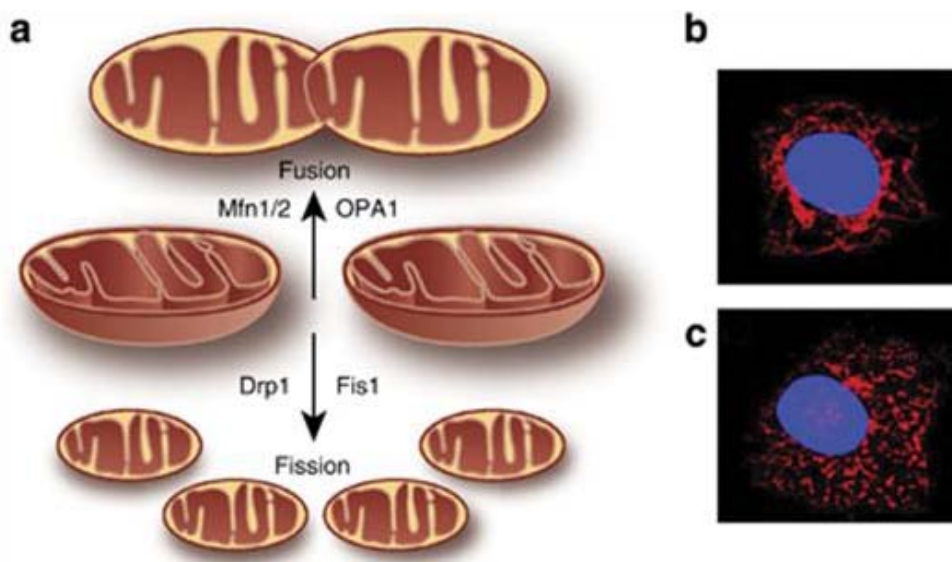


Figura 4.- Representación esquemática de los procesos de dinámica mitocondrial (a) e imagen de microscopía confocal de mitocondrias donde predomina la fusión (b) o la fisión (c). Extraído de Zhan et al. 2013. Mfn1/2, mitofusinas 1 y 2; OPA1, proteína de atrofia óptica 1; Drp1, proteína relacionada con la dinamina 1; Fis1, proteína de fisión 1

Independientemente de su papel sobre la fusión mitocondrial, la Mfn2 se ha revelado como estimuladora de la oxidación mitocondrial de sustratos, la respiración celular y el potencial de membrana mitocondrial, sugiriendo que puede jugar un papel importante en el metabolismo mitocondrial, y por tanto, en el balance energético (Bach, et al. 2003).

Fisión mitocondrial

La fisión da lugar a una fragmentación de la red mitocondrial en pequeñas partículas esféricas, facilitando la segregación equitativa de las mitocondrias en la división celular y promoviendo la distribución de las mitocondrias a lo largo del citoesqueleto (Lee, et al. 2004). Además, la fisión ayuda a aislar segmentos dañados de mitocondrias, promoviendo así su autofagia (Twig et al. 2008).

Para la fisión en mamíferos, se requieren al menos dos proteínas: la proteína relacionada con la dinamina 1 (Drp1, *dynamamin-related protein 1*) y la proteína de fisión 1 (Fis1, *fission protein 1*). Drp1 se localiza principalmente en el citosol, pero también se ha detectado unida a la membrana mitocondrial. Durante el proceso de fisión forma un collar alrededor del punto de fisión, provocando una constricción que potenciará la división (Smirnova, et al. 2001). Fis1 es una proteína transmembrana de la membrana externa mitocondrial que se presenta como la molécula que sirve de anclaje a Drp1 (Yoon, et al. 2003). Por otra parte, la reducción de los niveles de Fis1 mediante ARN de interferencia no ha disminuido la localización de Drp1 a la mitocondria (Lee et al. 2004), sugiriendo que existen otros factores implicados en la fisión mitocondrial.

La fisión mitocondrial presenta una característica que no se encuentra en la fusión, y es que las principales proteínas que regulan la fisión mitocondrial, también regulan la fisión de los peroxisomas (Koch, et al. 2003; Koch, et al. 2005), un dato muy relevante cuando se aborda la cuestión de las consecuencias fisiológicas de modular o regular los componentes de la maquinaria de fisión.

1.1.6. Disfunción mitocondrial

La disfunción mitocondrial se define de forma clásica como la incapacidad de la mitocondria para generar y mantener niveles de ATP suficientes a través de la fosforilación oxidativa en respuesta a las demandas energéticas (Brand y

Nicholls 2011). Sin embargo, el término se utiliza frecuentemente para definir deficiencias en la adaptación de las respuestas fisiológicas de la mitocondria que conllevan alteraciones metabólicas únicas o múltiples (Kusminski y Scherer 2012).

La disfunción mitocondrial se presenta habitualmente asociada a una situación de estrés oxidativo (Afanas'ev 2007; Mailloux y Harper 2012). Durante el funcionamiento normal de la cadena respiratoria mitocondrial se generan radicales libres, entre los que destacan las especies reactivas de oxígeno (ROS), originadas por la reacción entre los electrones derivados del proceso y moléculas de oxígeno. Los radicales libres son especies químicas con una vida media muy corta, inestables y altamente reactivas, por lo que son capaces de reaccionar con las biomoléculas alterando su estructura y su función. El organismo posee mecanismos de defensa frente a los ROS. Entre los mecanismos no enzimáticos destacan el glutatión y las vitaminas C y E, y entre los enzimáticos, la glutatión peroxidasa, la catalasa y la superóxido dismutasa. Los procesos de formación de radicales libres y los principales sistemas antioxidantes están esquematizados en la Figura 5.

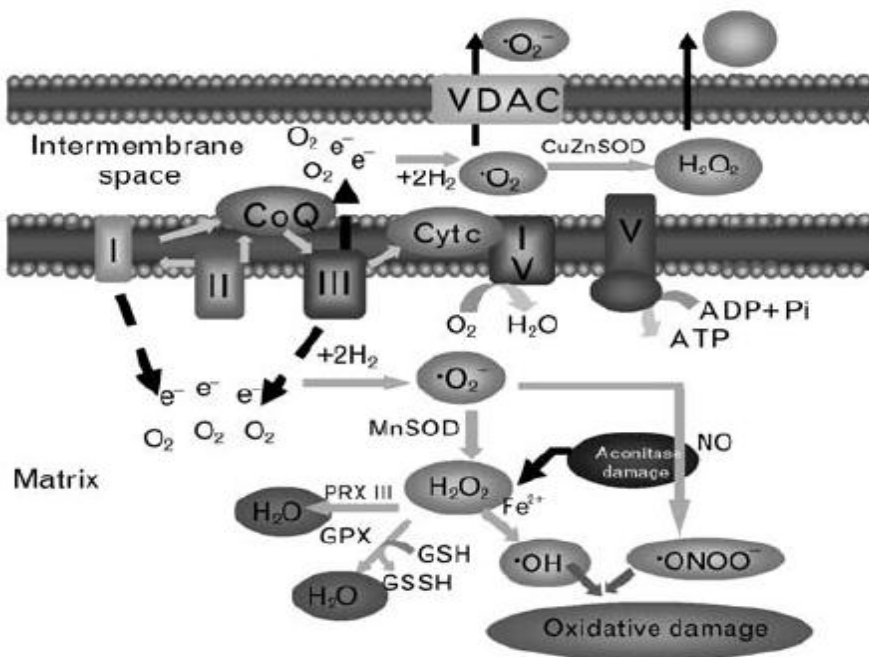


Figura 5.- Representación esquemática de la formación de radicales libres y de los principales sistemas antioxidantes. Extraído de Civitarese et al. 2007. SOD, superóxido dismutasa, GPx, glutatión peroxidasa; VDAC, canal aniónico dependiente de voltaje; CytC, citocromo c; CoQ, coenzima Q

Cuando la producción de radicales libres supera la capacidad antioxidante de la célula se habla de estrés oxidativo. La consecuencia de este desequilibrio es la alteración de moléculas fundamentales para el funcionamiento celular como proteínas, lípidos y ADN (Droge 2002) que se traduce en daño oxidativo. Además, los radicales libres circulantes median procesos de apoptosis (Buttke y Sandstrom 1994), que junto con las deficiencias en la función mitocondrial que comporta el estrés oxidativo así como los fallos en el propio acervo mitocondrial de las células se han asociado a patologías de índole muy diversa: enfermedades neurodegenerativas (Alzheimer, Parkinson, Huntington, esclerosis lateral amiotrófica), cáncer, neuropatías ópticas, fallos cardiacos en pacientes obesos, diabetes y otras (Carelli, et al. 2004; DiMauro y Schon 2003; Gogvadze, et al. 2009; Niemann, et al. 2011; Schapira 1998).

A modo de ejemplo se propone el modelo que relaciona la obesidad, la disfunción mitocondrial y la resistencia a la insulina. En los estados de obesidad aumenta la beta-oxidación (pudiendo saturar la cadena respiratoria mitocondrial), la producción de ROS y el daño oxidativo, así como los niveles intracelulares de metabolitos de los ácidos grasos. Tanto estas moléculas como los ROS terminan por activar quinasas de serina como la JNK (quinasa amino terminal c-jun) que fosforilan proteínas de la vía de señalización de la insulina, como los sustratos del receptor de insulina (IRS, *insulin receptor substrate*), en residuos críticos para su funcionamiento, de manera que se reduce la señalización de la insulina (Fridlyy and Philipson 2006; Lowell y Shulman 2005; Shulman 2000). Esta relación entre obesidad, disfunción mitocondrial y resistencia a la insulina es cada vez más evidente en tejidos como el músculo, el hígado o el tejido adiposo, en el que las adipoquinas se proponen como nexo entre ambos procesos (Beyer, et al. 2008; Koh, et al. 2007; Morino, et al. 2005; Wang, et al. 2013).

1.1.7. Dimorfismo sexual en la función y dinámica mitocondrial

Estudios previos de nuestro grupo han puesto de manifiesto la existencia de un dimorfismo sexual en la función y biogénesis mitocondriales de diversos tejidos de rata tanto en condiciones de alimentación estándar y con bajo contenido en grasa (Colom, et al. 2007a; Colom, et al. 2007b; Justo, et al. 2005a; Justo, et al. 2005b; Rodríguez-Cuenca, et al. 2002), como en respuesta a la restricción calórica (Colom et al. 2007b; Valle, et al. 2007a; Valle, et al. 2007b) o a la ingesta de dietas hiperlipídicas (Amengual-Cladera, et al. 2012a; Amengual-Cladera, et al. 2012c; Català-Niell, et al. 2008; Gómez-Pérez, et al. 2012; Gómez-Pérez, et al. 2011a; Nadal-Casellas, et al. 2010; Nadal-Casellas, et al. 2011a; Nadal-Casellas, et al. 2012). Estos estudios muestran que en todos los tejidos estudiados, que incluyen hígado, corazón, TAM, cerebro, músculo esquelético y tejido adiposo blanco (TAB), las ratas hembra presentan una

mayor capacidad oxidativa que los machos que se asocia a una mayor biogénesis mitocondrial. En el TAM estas diferencias se relacionan además con diferencias morfológicas consistentes en mitocondrias más grandes con mayor densidad y tamaño de sus crestas en las ratas hembra que en los machos (Rodríguez-Cuenca et al. 2002).

En el caso particular del TAB, el dimorfismo sexual presenta un perfil inverso en los depósitos retroperitoneal y gonadal, de forma que el periovárico presenta una población mitocondrial más diferenciada y funcional que el epididimal, mientras que el retroperitoneal de las hembras muestra una población mitocondrial menos diferenciada pero más abundante que la de los machos (Amengual-Cladera et al. 2012a; Amengual-Cladera et al. 2012c). Por otra parte, la mejor función mitocondrial y la mayor capacidad antioxidante del TAB en hembras se asocia a una mayor sensibilidad a la insulina en estas derivada de la mayor expresión de la adipocina adiponectina (Amengual-Cladera et al. 2012a; Amengual-Cladera et al. 2012c). Este dimorfismo sexual en la función mitocondrial se atenúa en situaciones de obesidad, que suponen también la pérdida de la asociación entre función mitocondrial y expresión de adiponectina (Amengual-Cladera et al. 2012a; Amengual-Cladera et al. 2012c).

En el músculo esquelético se ha descrito también un dimorfismo sexual en la función y biogénesis mitocondrial. El músculo esquelético de ratas hembra presenta una mayor diferenciación y contenido mitocondrial, así como una mayor capacidad OXPHOS que el de los machos (Colom et al. 2007a; Cortright, et al. 1997). Esta situación va acompañada por una mejor respuesta antioxidante que permitiría contrarrestar un aumento de estrés oxidativo (Gómez-Pérez et al. 2012). Además existen evidencias de que el músculo esquelético de las hembras presenta una mayor capacidad de adaptación al ejercicio que los machos (Tiidus 2000) y una mayor protección frente a los efectos perjudiciales de los lípidos sobre la acción de la insulina (Hevener, et

al. 2002) y frente al perfil de disminución de la masa muscular con el envejecimiento (Paturi, et al. 2010), así como una menor disminución de la capacidad antioxidante con la edad (Ko, et al. 2010). Este dimorfismo sexual en la función mitocondrial se asocia a una mayor susceptibilidad de las ratas macho a manifestar resistencia muscular a la insulina en respuesta a alteraciones fisiopatológicas como las causadas por la edad (Gómez-Pérez, et al. 2011b) o la ingesta rica en grasas (Gómez-Pérez et al. 2012).

Las hormonas sexuales, especialmente el 17β -estradiol (E2), se han propuesto como moduladoras del dimorfismo sexual en la función mitocondrial del tejido adiposo (Amengual-Cladera, et al. 2012b; Nadal-Casellas, et al. 2011b) y en la mayor protección de las hembras frente a la producción de ROS, que se atribuye a una mayor actividad de los enzimas antioxidantes (Borrás, et al. 2005). El E2 mejora la capacidad mitocondrial a través de la activación de la expresión de proteínas específicas de la maquinaria mitocondrial. Por ejemplo, la funcionalidad del músculo esquelético se ve directamente afectada por cambios en las hormonas sexuales (testosterona y estradiol) tanto en machos como en hembras (Ramamani, et al. 1999). El mecanismo a través del que modulan la expresión se basa en la activación de los receptores de estrógenos, que se unirán a los elementos de respuesta a estrógenos (EREs, *estrogen response elements*) en el promotor de NRF1, que actuará a su vez sobre el TFAM (Mattingly, et al. 2008). Además de en la biogénesis mitocondrial, los estrógenos influyen en el estado redox celular por su propia estructura fenólica (Ruiz-Larrea, et al. 1997) y modulando la capacidad antioxidante a través de cambios en la actividad y la expresión de los enzimas antioxidantes (Hamden, et al. 2007; Yu, et al. 2012).

Para profundizar en los efectos de los estrógenos, se utiliza la ovariectomía como una herramienta efectiva de manipulación del estado hormonal en diversos modelos animales. La ovariectomía ha permitido profundizar por

ejemplo en el papel que juegan las hormonas ováricas en el dimorfismo sexual en la función mitocondrial del tejido adiposo (Amengual-Cladera et al. 2012b; Nadal-Casellas et al. 2011b) y en el metabolismo del músculo esquelético (Beckett, et al. 2002; Moustafa y Boshra 2011), en la diferencia entre la esperanza de vida de machos y hembras (Borrás, et al. 2003) y en los cambios metabólicos e inflamatorios que acompañan a la menopausia (Kamei, et al. 2005; Kireev, et al. 2010).

1.2. EL TEJIDO ADIPOSO BLANCO COMO ÓRGANO ENDOCRINO

El tejido adiposo blanco está compuesto principalmente por grandes adipocitos esféricos empaquetados de forma compacta. A diferencia de los adipocitos multiloculares del tejido adiposo marrón, los adipocitos blancos contienen una única vacuola lipídica grande que desplaza el núcleo y el citoplasma a la periferia de la célula (Ibrahim 2010). Para mantener su estructura, los propios adipocitos secretan una lámina basal que, junto con la matriz externa de proteoglicanos y proteínas, reduce las fuerzas externas y asegura la integridad estructural y funcional del tejido (Mariman y Wang 2010). Además de las células adiposas, en el TAB existe la fracción estromal vascular, que contiene células madre multipotentes, preadipocitos, fibroblastos, pericitos y células epiteliales de los vasos sanguíneos y linfáticos, macrófagos y otras células del sistema inmune (Subramanian y Ferrante 2009). La densa red de capilares que envuelve el TAB lo provee de sustratos y de oxígeno suficientes asegurando, asimismo, las rutas para la correcta liberación de los agentes biológicos sintetizados en el tejido.

Los distintos depósitos en los que se sitúa el TAB se dividen según su localización anatómica en viscerales (retroperitoneal, gonadal y mesentérico) y subcutáneos (inguinal). Estos depósitos varían en sus propiedades estructurales y bioquímicas (Pond y Mattacks 1991; Wronska y Kmiec 2012), así como en su distribución entre machos y hembras, lo que parece estar relacionado con las diferencias en la incidencia de determinadas patologías metabólicas y cardiovasculares en machos y hembras (Ohlson, et al. 1985). Son tan importantes las diferencias entre depósitos que se utiliza en ocasiones el término “miniórganos” para referirse a los mismos (Kirkland, et al. 1996).

El TAB está especializado en el almacenamiento y la movilización de reservas energéticas en forma de triacilglicéridos (TAG). La capacidad de este tejido

para almacenar energía es virtualmente ilimitada, con un gran potencial para aumentar la acumulación de TAG. Este aumento puede ocurrir a través de dos mecanismos: bien aumentando la cantidad de lípidos almacenados en cada célula favoreciendo la lipogénesis sobre la lipólisis, o bien aumentando el número de células a partir de los preadipocitos (Prins y O'Rahilly 1997). Esta capacidad es una ventaja evidente a corto plazo, pero puede constituir una desventaja en la supervivencia a largo plazo (desarrollo de obesidad).

Sin embargo, esta función de almacenamiento de energía no es la única función del TAB. En 1953, Kennedy planteó que la regulación de la ingesta en ratas debía estar controlada por ciertos metabolitos circulantes relacionados, de algún modo, con los depósitos grasos (Kennedy 1953). A lo largo de las siguientes décadas, se ha demostrado esta hipótesis a través del descubrimiento de numerosas sustancias liberadas por el tejido adiposo que juegan un papel crítico en el mantenimiento de la homeostasis energética y cuya secreción se ve afectada por, y a su vez afecta, a las desregulaciones metabólicas. Estas sustancias reciben el nombre de adipoquinas o adipocitoquinas.

Las adipoquinas interaccionan con órganos centrales y periféricos tales como el músculo esquelético, el hígado, el páncreas, el cerebro y el sistema vascular para influir en un gran número de procesos metabólicos como el metabolismo de los carbohidratos, el de los lípidos, los procesos inflamatorios, la coagulación sanguínea y tensión arterial, el gasto energético y el comportamiento alimentario (Chu, et al. 2001; Ran, et al. 2006; Yamauchi, et al. 2001). Algunas de estas adipoquinas y sus principales funciones se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1.- Algunas adipoquinas y sus principales funciones conocidas.

Adiponectina:

Supresión de gluconeogénesis hepática; estimulación de oxidación de los ácidos grasos en hígado y músculo esquelético; estimulación de captación de energía en músculo esquelético y de la secreción de insulina; mejora de la sensibilidad a la insulina; modulación de la ingesta y el gasto energético; acciones antiinflamatorias; acciones antiescleróticas.

Leptina:

Represión de la ingesta; promoción del gasto energético; estimulación de la oxidación de ácidos grasos en hígado, páncreas y músculo esquelético; modulación de la gluconeogénesis hepática y de la función β -pancreática; mejora de la sensibilidad a la insulina.

Resistina:

Inducción de resistencia a la insulina en ratón; promoción de la disfunción endotelial.

TNF α :

Modulación de la señalización de la insulina en hígado y músculo esquelético; reducción de la sensibilidad a la insulina; lipolítica.

IL-6:

Reducción de la sensibilidad a la insulina; lipolítica; proinflamatoria.

Visfatina:

Estimulación de la secreción de insulina en ratón.

Omentina:

Potenciación de la acción de la insulina.

Adipsina:

Estimulación del almacenamiento de TAG en el adipocito.

Recopilado de Ahima 2006; Fonseca-Alaniz et al. 2007; Harwood 2012; Rabe et al. 2008; Ronti et al. 2006. TNF α , factor de necrosis tumoral alfa; IL-6, interleuquina 6.

La sobrecarga crónica de nutrientes que acompaña a la obesidad conduce a un aumento del tamaño de los adipocitos cuando la capacidad de expansión del TAB es baja (Lionetti, et al. 2009). Estos adipocitos hipertróficos tienen menos capacidad para absorber el flujo de energía incrementado en el TAB, lo que conlleva una pérdida de funcionalidad del adipocito que incluye desajustes

en la secreción de adipoquinas (Heilbronn, et al. 2004). Además, el TAB parece ser el órgano que más acusa el proceso inflamatorio asociado al estado de sobrealimentación, de modo que la inflamación agrava la disfunción adipocitaria.

Estos desajustes en la secreción de las adipoquinas provocados por la obesidad, derivados de la expansión del tejido adiposo y del proceso inflamatorio, juegan un papel fundamental en el desarrollo de desórdenes cardiovasculares y metabólicos incluyendo el síndrome metabólico y la diabetes tipo 2 (Hajer, et al. 2008; Lehr, et al. 2012; Zhang and Zhang 2010).

1.2.1. La adiponectina, una adipoquina multifuncional

La adiponectina también es conocida como adipoQ, *adipocyte complement-related protein of 30KDa* (ACRP30), *adipose most abundant gene transcript 1* (APM1) y como *gelatin binding protein of 28KDa* (GBP28), ya que fue identificada simultáneamente por cuatro grupos (Hu, et al. 1996; Maeda, et al. 1996; Nakano, et al. 1996; Scherer, et al. 1995). Es una proteína de 30kDa con un dominio de colágeno N-terminal y un dominio globular C-terminal. Las moléculas individuales de adiponectina, conocidas también como “forma globular de adiponectina”, se pueden unir en forma de homomultímero dando lugar a las moléculas conocidas como FLA (*full length adiponectin*). Los trímeros (formas de bajo peso molecular - LMW, *low molecular weight* -) son el bloque a partir de la cual se forman los complejos de mayor orden: los hexámeros o de peso molecular intermedio (MMW, *medium molecular weight*) y los oligómeros de más de 6 unidades que se engloban bajo la denominación general de “formas de alto peso molecular” (HMW, *high molecular weight*) (Kadowaki y Yamauchi 2005). Todas estas formas multiméricas de adiponectina se pueden encontrar en el suero asociadas a proteínas séricas (Wang, et al. 2006b).

Aunque el TAB es la principal fuente de adiponectina del organismo, esta se sintetiza también en otros tejidos como el músculo esquelético, cardiomiocitos, células epiteliales, tejido fetal, osteoblastos o médula ósea (Nishida, et al. 2007), lo que sugiere la existencia de un papel complementario autocrino/paracrino de la adiponectina en tejidos diferentes al TAB. De hecho, la adiponectina modula múltiples procesos metabólicos que se esquematizan en la Figura 6. Bajos niveles de adiponectina se han relacionado con la obesidad (Arita, et al. 1999), con la diabetes tipo 2, ya que la adiponectina participa en la regulación del metabolismo lipídico y glucídico (Berg, et al. 2002; Tsao, et al. 2002), y con un aumento sistémico del estrés oxidativo (Motoshima, et al. 2004). La adiponectina presenta efectos antiaterogénicos a través de la supresión de moléculas vasculares de adhesión celular que dificultan la unión de los macrófagos a las paredes endoteliales (Ouchi, et al. 1999) y también actúa contra los procesos inflamatorios, disminuyendo la secreción de citoquinas proinflamatorias (Goldstein, et al. 2009) e induciendo la producción de moléculas antiinflamatorias (Tilg y Moschen 2006), lo que la convierte en un factor muy relevante en el desarrollo y evolución de patologías cardiovasculares (Maeda, et al. 2013). Además, existen evidencias de la acción de la adiponectina como hormona anticancerígena a través de sus efectos antiangiogénicos y/o proapoptóticos (Perrier y Jarde 2012).

La mayoría de estos efectos se llevan a cabo a través de la unión de adiponectina a receptores. Hasta el momento se han identificado tres tipos: los receptores de adiponectina AdipoR1 y AdipoR2 y la T-cadherina. AdipoR1 y AdipoR2 son receptores con siete dominios transmembrana con un alto grado de homología. El primero se expresa predominantemente en músculo esquelético y tiene elevada afinidad por la adiponectina globular, mientras que el segundo se encuentra primordialmente en los hepatocitos y tiene una afinidad intermedia por las formas globulares y las HMW (Yamauchi, et al.

2003a). La unión de la adiponectina al receptor T-cadherina se ha relacionado con la protección a nivel cardíaco y parece ser que precisa de la intervención de los AdipoR como parte de la vía de transducción de la señal (Denzel, et al. 2010).

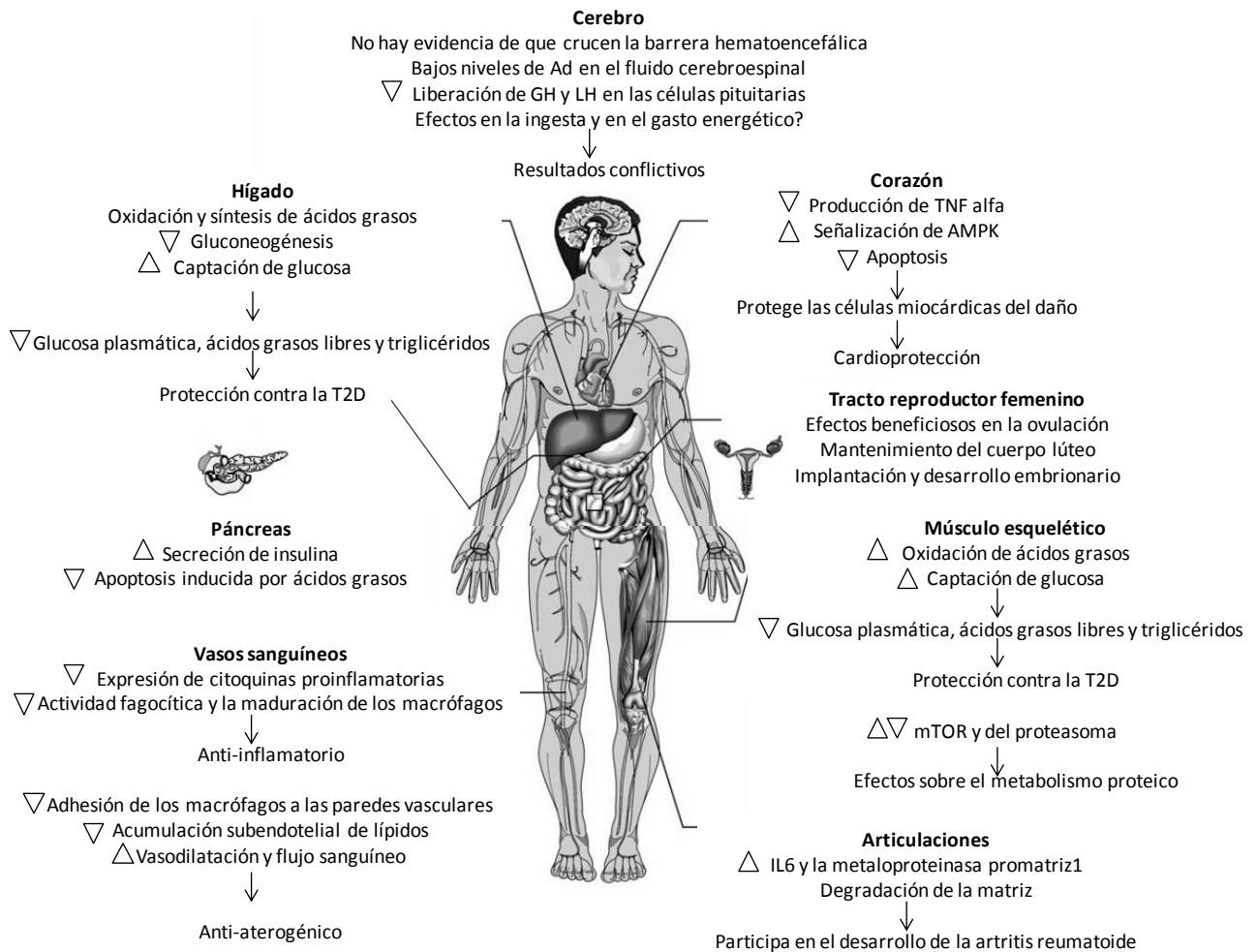


Figura 6.- Función de la adiponectina en los principales órganos y tejidos. Adaptado de Brochu-Gaudreau et al. 2012

1.2.2. Influencia de las hormonas sexuales en el metabolismo del tejido adiposo

Las hormonas sexuales son factores de gran importancia en la regulación del balance energético y el peso corporal, influenciando tanto el metabolismo del tejido adiposo como su distribución (Bjorntorp 1997). Por ejemplo, la obesidad andrógina, que es un importante factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, se caracteriza por una deposición excesiva de grasa abdominal y visceral, mientras que la obesidad ginoide implica una acumulación de grasa en la región subcutánea femoral (Bjorntorp 1991).

Numerosos estudios sugieren un papel directo de las hormonas sexuales sobre el control del metabolismo de los tejidos adiposos, y de hecho, la existencia de receptores de andrógenos, estrógenos y progesterona en los adipocitos (Dieudonne, et al. 2000; Mizutani, et al. 1994; O'Brien, et al. 1998; Rodríguez-Cuenca, et al. 2005) sugiere que las hormonas sexuales pueden actuar directamente sobre estas células. Así, la testosterona ejerce importantes efectos en la regulación del proceso lipolítico (Xu, et al. 1990; Xu, et al. 1991), alterando la dotación de receptores adrenérgicos así como modulando la actividad y/o la expresión de enzimas de la beta oxidación (Giudicelli, et al. 1993; Pecquery, et al. 1990). Además, la testosterona ha sido descrita como una hormona antiadipogénica, ya que inhibe la diferenciación de los preadipocitos, reduce la producción y la secreción de leptina y de adiponectina de elevado peso molecular e inhibe tanto la entrada de lípidos en la célula como la actividad de la lipoproteína lipasa (De Pergola 2000; Xu, et al. 2005).

En contraste con los andrógenos, los estrógenos y la progesterona presentan efectos proadipogénicos (Amengual-Cladera et al. 2012b; Giudicelli et al. 1993; Monjo, et al. 2005; Wade, et al. 1985), aunque los mecanismos moleculares subyacentes son diferentes, ya que mientras los estrógenos actúan a través de la modulación de receptor del factor de crecimiento insulínico 1

(IGF1R, *insulin growth factor 1 receptor*), PPAR γ 2 (Dieudonne et al. 2000) y los receptores adrenérgicos (Monjo et al. 2005; Pedersen, et al. 2004), la progesterona estimula la expresión de ADD1/SREBP1c, un factor de transcripción fundamental en el proceso de adipogénesis (Rosen, et al. 2000).

La correcta funcionalidad del TAB está muy influenciada por el estado de la función mitocondrial (Lu, et al. 2010) de modo que la disfunción mitocondrial puede alterar la síntesis de adipoquinas, entre ellas de adiponectina (Koh et al. 2007; Wang et al. 2013). En este sentido es relevante el dimorfismo sexual existente en la biogénesis mitocondrial del TAB, que supone que las ratas hembra presentan una mejor función mitocondrial y una mayor capacidad antioxidante que los machos que asociada a una mayor sensibilidad a la insulina derivada de la mayor expresión de adiponectina (Amengual-Cladera et al. 2012a; Amengual-Cladera, et al. 2012). El E2 aparece como importante modulador de dichas diferencias en el acervo mitocondrial (Amengual-Cladera et al. 2012b), lo que sugiere que los niveles de adiponectina podrían verse también influidos por las hormonas sexuales. De hecho, los niveles de adiponectina circulantes presentan un dimorfismo sexual tanto en humanos como en roedores, de modo que las hembras muestran mayores concentraciones que los machos (Riestra, et al. 2013). La expresión de adiponectina en el TAB también es mayor en machos que en hembras (Amengual-Cladera et al. 2012a; Amengual-Cladera et al. 2012), un hecho que se ha asociado con las hormonas sexuales en humanos (Riestra et al. 2013; Wildman, et al. 2013). En este sentido se sabe que los andrógenos correlacionan negativamente con los niveles de adiponectina (Nishizawa, et al. 2002), pero el papel de los estrógenos ha dado lugar a resultados contrapuestos y sigue siendo tema de estudio (de Oliveira, et al. 2012).

1.2.3. Tiazolidinedionas

Los PPARs son factores de transcripción activados por ligando que pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares. El PPAR γ , el tercer miembro de este conjunto, que incluye también el PPAR α y el PPAR δ , es un elemento central en los mecanismos moleculares que controlan la adipogénesis y, por tanto, la masa grasa corporal (Willson, et al. 2000).

Existen tres isoformas del ARNm del PPAR γ , que provienen del uso de diferentes promotores para su transcripción y del *splicing* alternativo: el PPAR γ 1 y el PPAR γ 3 codifican para el mismo producto proteico, mientras que la proteína codificada por el PPAR γ 2 contiene 28 aminoácidos adicionales en su extremo amino-terminal. La expresión del receptor es ubicua, incluyendo el colon, músculo esquelético, hígado y corazón, pero abunda sobretodo en el tejido adiposo (Braissant, et al. 1996; Schoonjans y Auwerx 2000), donde se encuentran principalmente las isoformas 2 y 3 (Fajas, et al. 1997).

Las tiazolidinedionas (TZDs) son ligandos de elevada afinidad del PPAR γ (Lehmann, et al. 1995; Spiegelman 1998), aunque algunas actúan también sobre otros miembros de la familia, lo que explicaría las variaciones en los efectos metabólicos de los diferentes compuestos (Westerink y Visseren 2011). Las TZDs son fármacos que mejoran la sensibilidad a la insulina, por lo que se usan en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 (Papaetis, et al. 2011). Tras la unión TZD-PPAR γ , se forma un heterodímero con el receptor X de retinoides (RXR) que recluta coactivadores (como el PGC1) y correpresores que modulan la transcripción. Algunos de los genes regulados son la ALBP/aP2 (*adipocyte lipid binding protein aP2*), la acyl-CoA sintasa, el transportador de ácidos grasos FATP (*fatty acid transport protein*) y SREBP1 (*sterol regulatory element binding protein 1*) (Gastaldelli, et al. 2007). La activación de estos factores induce la remodelación del tejido adiposo, lo que incluye la

diferenciación de preadipocitos en adipocitos metabólicamente activos, y un cambio en la distribución de la grasa, que pasa a almacenarse en depósitos subcutáneos y no en los viscerales (Belfort, et al. 2006; Ratzliff, et al. 2010). Además se reducen los ácidos grasos libres circulantes y por tanto disminuye la deposición de grasa en hígado y músculo, mejorando la sensibilidad a la insulina en estos tejidos (Marchesini, et al. 2001) y la gluconeogénesis hepática (Gastaldelli et al. 2007; Gastaldelli, et al. 2006).

La activación del PPAR γ a través de las TZDs influye también en la secreción de adipoquinas del tejido adiposo favoreciendo la sensibilidad a la insulina (Coletta, et al. 2009). Concretamente, la pioglitazona aumenta la liberación de adiponectina de elevado peso molecular, la más efectiva, y disminuye la de TNF α y RBP-4, ambos factores promotores de la resistencia a la insulina, en pacientes con diabetes tipo 2 (Aso, et al. 2007; Lin, et al. 2008; Miyazaki, et al. 2002). Por su parte, la rosiglitazona aumenta los niveles de leptina y de adiponectina (Hoo, et al. 2007; Kim, et al. 2008; Van Harmelen, et al. 1998).

Además de promover la diferenciación adipocitaria y el metabolismo lipídico a través de la regulación de la expresión génica, las TZDs inducen la biogénesis mitocondrial en el tejido adiposo (Bogacka, et al. 2005; Choo, et al. 2006). Esto conlleva una estimulación de la oxidación de ácidos grasos (Boden, et al. 2005; Phielix, et al. 2011) que resulta de nuevo en una reducción del contenido de lípidos intracelulares en hígado y músculo (Belfort et al. 2006; Mayerson, et al. 2002), mejorando así la sensibilidad a la insulina.

Las TZD presentan también un mecanismo de acción no genómico a través de su unión a la proteína MitoNEET (Colca, et al. 2004). MitoNEET es una proteína integral de la membrana externa mitocondrial que presenta un dominio hidrofílico al citoplasma, por lo que presenta una posición ideal para la comunicación de señales entre la mitocondria y el resto de la célula,

mostrándose como un regulador clave de la cadena de transporte electrónico y la fosforilación oxidativa (Wiley, et al. 2007a; Wiley, et al. 2007b).

1.3. EL MÚSCULO ESQUELÉTICO: DIANA DE LA ADIPONECTINA

El músculo esquelético es el tejido más abundante del organismo, llegando a constituir hasta un 50% de la masa corporal (Gunn 1989). Al ser el responsable del movimiento, desempeña un papel crucial en el metabolismo energético (Matsakas y Patel 2009), por lo que cuenta con un elevado contenido en mitocondrias para producir la energía necesaria para la contracción muscular (Johannsen y Ravussin 2009). Además, es un tejido altamente adaptable que responde a los estímulos con cambios en tamaño, composición y comportamiento metabólico. La insulina es el principal factor que restringe la lipólisis en los adipocitos y estimula la captación de glucosa en el músculo, de modo que en condiciones de ayuno los ácidos grasos libres son la principal fuente de energía en el músculo esquelético, mientras que en el estado postabsortivo lo es la glucosa (Groop, et al. 1989). La capacidad para pasar de la oxidación lipídica en estado de ayuno a la oxidación de glucosa en estado postprandial se denomina *flexibilidad metabólica* (Abdul-Ghani y DeFronzo 2010).

Una característica importante que subyace a la capacidad del tejido muscular para adaptarse a los cambios es el hecho de contener células con diferentes propiedades metabólicas y contráctiles organizadas en fibras musculares (Westerblad, et al. 2010). Las fibras musculares se generan a partir de la unión de miofibras, que son estructuras sincitiales derivadas de la fusión de los mioblastos. Las fibras del tipo I son las conocidas como fibras lentas, con elevado contenido en mitocondrias, metabolismo predominantemente oxidativo y gran resistencia a la fatiga, mientras que las fibras de tipo II o fibras rápidas tienen menor contenido mitocondrial y son eminentemente glucolíticas (Zierath y Hawley 2004).

1.3.1. Disfunción mitocondrial en el músculo esquelético. Relación con la resistencia a la insulina

Debido a su masa, el músculo esquelético es el principal tejido responsable de la captación de glucosa dependiente de insulina, por lo que cuantitativamente, el músculo es el tejido más afectado por la resistencia a la insulina (DeFronzo, et al. 1985). Las formas más comunes de resistencia a la insulina en el músculo esquelético están asociadas con la obesidad o bien con la inactividad física. La obesidad se asocia con una reducción del contenido mitocondrial y con una función mitocondrial alterada (Kelley, et al. 2002), y la falta de ejercicio físico con una reducción de la biogénesis y el contenido mitocondrial (Rimbert, et al. 2004), por lo que las deficiencias en la función mitocondrial se han propuesto como el factor común a estas dos condiciones. De hecho, independientemente de su etiología, la resistencia a la insulina en el músculo esquelético está ligada a una disminución de la fosforilación oxidativa mitocondrial (Abdul-Ghani y DeFronzo 2010) (Figura 7).

La hipótesis predominante para conectar la función mitocondrial con la resistencia a la insulina se basa en que un menor contenido mitocondrial o una oxidación de ácidos grasos defectuosa conduce a una acumulación de lípidos intramiocelulares (Coen y Goodpaster 2012), que se ha relacionado con la resistencia a la insulina, aunque existe un considerable debate sobre la relación mecanística entre ambos hechos (Goodpaster 2013). Un hecho a favor de esta relación es que la flexibilidad metabólica del músculo se ve comprometida por la reducción del contenido y la capacidad mitocondrial, resultando en una disminución de la oxidación de ácidos grasos que deriva a la acumulación lipídica y la resistencia a la insulina (Kelley, et al. 1999). Además, la desviación hacia el metabolismo lipídico en modelos genéticos protege de la resistencia a la insulina inducida por la dieta (Abu-Elheiga, et al. 2003; Perdomo, et al. 2004).

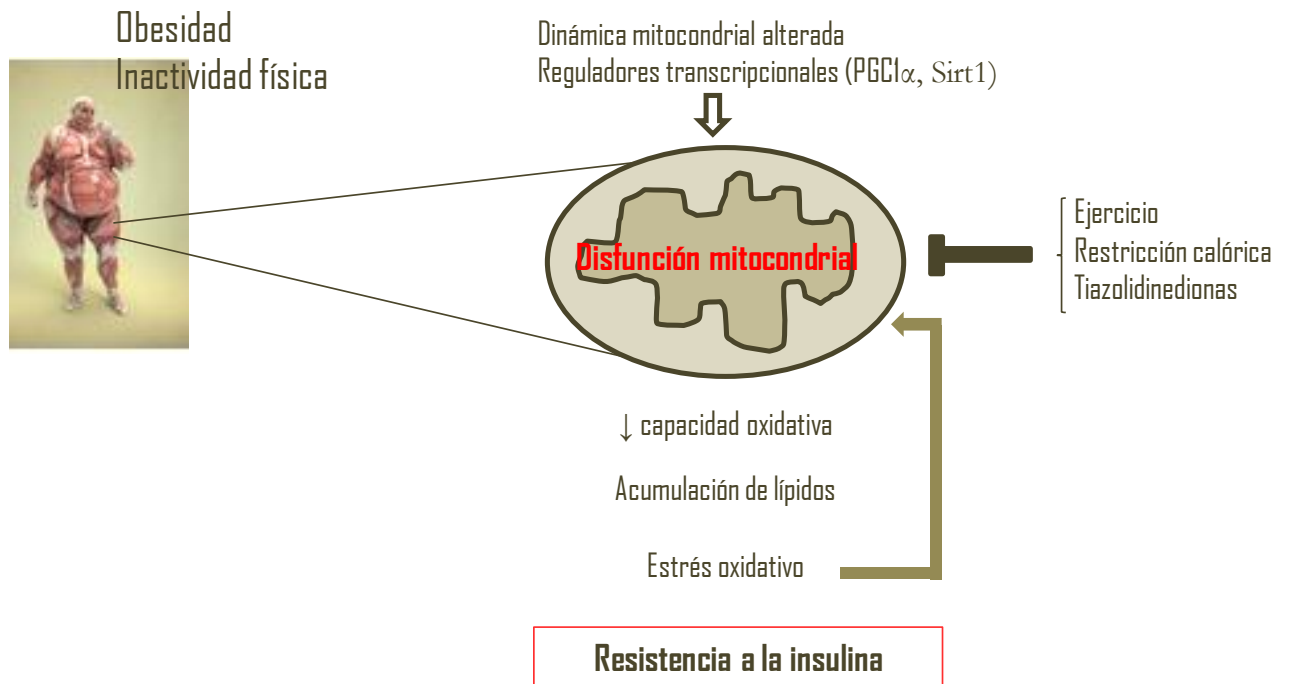


Figura 7.- Esquema simplificado que ilustra el papel de la disfunción mitocondrial en la patogénesis de la diabetes tipo 2 en el músculo esquelético. Modificado de Joseph et al. 2012.

Un segundo modelo propone que una sobrecarga metabólica mitocondrial que conduce a la acumulación de metabolitos intermedios puede conllevar el desarrollo de resistencia a la insulina (Koves, et al. 2008), aunque queda por determinar si un aumento en el contenido o función mitocondrial podrían reducir el estrés metabólico y mantener la sensibilidad a la insulina.

Otros paradigmas propuestos se basan en los efectos del estrés oxidativo, ya que los ROS alteran el ADN, los lípidos y las proteínas mitocondriales, provocando disfunción mitocondrial. De hecho, en estados de obesidad, elevados niveles de estrés oxidativo agravan la resistencia a la insulina mientras que un aumento de los sistemas de defensa antioxidantes la mejoran (Anderson, et al. 2009). Además, los ROS pueden provocar la activación de procesos inflamatorios, que también afectarían al buen funcionamiento mitocondrial (Zhou, et al. 2011).

1.3.2. Papel de la adiponectina en el músculo esquelético

Los resultados obtenidos a partir de co-cultivos de adipocitos y miocitos pusieron de manifiesto que la adiponectina previene la inducción de resistencia a la insulina en el músculo actuando de forma autocrina en los adipocitos, en los cuales reduce la síntesis de adipoquinas cuyos efectos se han relacionado con la resistencia a la insulina (Dietze-Schroeder, et al. 2005). De este modo se explicaría la relación entre obesidad y desarrollo a la insulina en músculo esquelético, ya que como se ha mencionado anteriormente, la adiponectina es la única adipoquina que se ve disminuida en el estado obeso (Lihn, et al. 2005).

La adiponectina tiene también efectos directos sobre el músculo, ya que estimula la oxidación de ácidos grasos disminuyendo el contenido lipídico y potenciando por tanto la sensibilidad a la insulina (Yamauchi, et al. 2002). La mayor parte de los efectos de la adiponectina en el músculo los lleva a cabo la adiponectina globular, ya que es la que más afinidad presenta por el adipoR1, el receptor de adiponectina más abundante en el músculo esquelético (Yamauchi et al. 2003a). Los mediadores moleculares de estos efectos son el PPAR α y la AMPK (Yamauchi et al. 2002; Yamauchi, et al. 2003b; Yamauchi et al. 2001). Por otra parte, la adiponectina aumenta la función y la masa mitocondrial del músculo esquelético a través de la activación del PGC1 α inducida por la AMPK (Civitarese, et al. 2006). Esta activación estimula la biogénesis mitocondrial y promueve la transcripción de genes relacionados con el metabolismo oxidativo, lo que mejoraría también la sensibilidad a la insulina (Gurd, et al. 2009).

Como ya se ha mencionado, el músculo esquelético es capaz de sintetizar adiponectina. Además, este tejido presenta la capacidad para realizar modificaciones transcripcionales en la adiponectina, generando formas biológicamente activas (Wang, et al. 2006a).

La adiponectina sintetizada en el músculo esquelético actúa a nivel autocrino, de modo que influencia el fenotipo y la función muscular. De hecho la síntesis de adiponectina se correlaciona con una menor acumulación de lípidos intramiocelulares que conlleva una mejora de la sensibilidad a la insulina en este tejido (Krause, et al. 2008; Liu, et al. 2009). Además, la expresión muscular de adiponectina se altera en estados patológicos, y el tratamiento con rosiglitazona permite restaurar el déficit en la expresión de adiponectina (Liu et al. 2009), probablemente a través de la activación de PPAR γ en el músculo, que se ha demostrado que afecta directamente al fenotipo muscular, al metabolismo lipídico y a la secreción de adiponectina funcional (Amin, et al. 2010).

Por otra parte, la adiponectina producida en el músculo podría contribuir a los niveles circulantes de la hormona, suponiendo una fuente adicional de señalización de adiponectina que se sumaría a los efectos de la hormona circulante (Amin et al. 2010).



*Objetivos y planteamiento
experimental*

El presente estudio se enmarca en un proyecto más amplio desarrollado por el grupo de investigación de Metabolismo Energético y Nutrición de la *Universitat de les Illes Balears*, que pretende profundizar en los mecanismos moleculares implicados en el dimorfismo sexual existente en la función y biogénesis mitocondrial y su asociación con el desarrollo de diversas patologías que tienen como característica común la disfunción mitocondrial y la resistencia a la insulina.

El objetivo general de esta tesis doctoral se ha centrado en la caracterización de los efectos de las hormonas sexuales sobre la función mitocondrial y la expresión de adiponectina en el eje adipo-muscular de la rata. Para la consecución de este objetivo se han combinado estudios *in vivo* en los que se ha utilizado la rata como animal de experimentación, y estudios *in vitro* con líneas celulares de adipocitos blancos 3T3-L1 y miotubos L6E9. Los experimentos se han desarrollado en el marco de dos contextos:

- A. **Sobrepeso e intolerancia a la glucosa**, ambas situaciones asociadas a la alimentación con una dieta hiperlipídica, **y bajo tratamiento con rosiglitazona** (Rsg), un fármaco que mejora la sensibilidad a la insulina.
- B. **Influencia del entorno hormonal**, tanto **fisiológico** (animales de ambos sexos), como **manipulado** (animales ovariectomizados y suplementados con E2), así como cultivos celulares de adipocitos y miocitos tratados con E2, testosterona (T), progesterona (Pg) y rosiglitazona.

Estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación han puesto de manifiesto la existencia de un dimorfismo sexual en la función y biogénesis mitocondriales de diferentes tejidos de rata, tanto en condiciones de alimentación estándar y con bajo contenido en grasa (Colom et al. 2007a; Colom et al. 2007b; Justo et al. 2005a; Justo et al. 2005b; Rodríguez-Cuenca et al. 2002), como en respuesta a la restricción calórica (Colom et al. 2007b; Valle

et al. 2007a; Valle et al. 2007b) o a la ingesta de dietas hiperlipídicas (Amengual-Cladera et al. 2012a; Amengual-Cladera et al. 2012; Català-Niell et al. 2008; Gómez-Pérez et al. 2012; Gómez-Pérez et al. 2011a; Nadal-Casellas et al. 2010; Nadal-Casellas et al. 2011a; Nadal-Casellas et al. 2012). Según dichos estudios, las ratas hembra presentan una mejor función mitocondrial y una mayor capacidad antioxidante que los machos que se asocia además a una mayor sensibilidad a la insulina (Amengual-Cladera et al. 2012a; Amengual-Cladera et al. 2012). Estudios recientes han permitido proponer el E2 como un importante modulador del dimorfismo sexual en la función mitocondrial del tejido adiposo (Amengual-Cladera et al. 2012b; Nadal-Casellas et al. 2011b) y de otros tejidos (Moreira, et al. 2011; Yang, et al. 2004), ya que activa la expresión de proteínas específicas de la maquinaria mitocondrial (Mattingly et al. 2008). Por otra parte, la correcta funcionalidad mitocondrial del TAB se ha revelado indispensable para la síntesis adecuada de la adiponectina, un factor sensibilizante a la insulina que destaca entre las citoquinas sintetizadas por el TAB (Koh et al. 2007; Wang et al. 2013), pero que también se expresa en músculo esquelético, donde ejerce una función autocrina afectando a la contracción muscular, al fenotipo y al metabolismo (Krause et al. 2008; Liu et al. 2009).

Del conocimiento de la existencia de dicho dimorfismo sexual, del papel específico del E2 y de la relación entre función mitocondrial y síntesis de adiponectina parten los objetivos específicos planteados en la presente tesis.

1. Evaluar el *papel de las hormonas sexuales en la función y biogénesis mitocondriales y su relación con la síntesis de adiponectina en el tejido adiposo*, y si *la modulación de la respuesta al tratamiento con rosiglitazona es dependiente del sexo*.

2. Analizar el ***papel de las hormonas sexuales, especialmente del E2, en la función y biogénesis mitocondrial del músculo esquelético y su conexión con la síntesis de adiponectina.***

El primer objetivo se basa en los resultados previos de nuestro grupo de investigación en relación a la existencia de un dimorfismo sexual en la funcionalidad mitocondrial del TAB, que han puesto de manifiesto que las ratas hembra presentaban mitocondrias más diferenciadas y funcionales en el TAB gonadal, mostrando además un mejor perfil de sensibilidad a la insulina (Amengual-Cladera et al. 2012a; Amengual-Cladera et al. 2012).

Para evaluar de forma más directa el papel de las hormonas sexuales en la función y biogénesis mitocondriales y en su relación con la síntesis de adiponectina en el tejido adiposo se realizó un experimento *in vitro* con adipocitos blancos 3T3-L1. Estos se trataron con concentraciones farmacológicas de hormonas sexuales de forma independiente (E2, Pg y T) o combinada (Pg+E2, T+E2). Además, dado que los progestágenos en elevadas dosis pueden unirse a los receptores androgénicos, y que la Pg puede ser convertida en T en el tejido adiposo, usamos la flutamida (FLT). La FLT es un compuesto que bloquea los receptores de andrógenos, por lo que su administración, conjunta con Pg y T, permite determinar si los efectos de dichas hormonas se están llevando a cabo o no a través de los receptores de andrógenos. En estas células se determinaron marcadores de proliferación, diferenciación y dinámica mitocondrial, así como los niveles de adiponectina (tanto intracelular como secretada) y sus receptores.

Los resultados obtenidos y sus conclusiones se detallan en el **capítulo 4.1**.

Como ya se ha indicado, el dimorfismo sexual en la función y biogénesis mitocondrial es un fenómeno que también se ha observado en el músculo esquelético. Se ha descrito que este tejido presenta en las ratas hembra una mayor diferenciación y contenido mitocondrial, así como una mayor

capacidad OXPHOS que el de los machos (Colom et al. 2007a; Cortright et al. 1997). Esta situación va acompañada por una mejor respuesta antioxidante que permitiría contrarrestar un aumento de estrés oxidativo (Gómez-Pérez et al. 2012). Este dimorfismo sexual en la función mitocondrial se asocia a una mayor susceptibilidad de las ratas macho a manifestar resistencia muscular a la insulina en respuesta a alteraciones fisiopatológicas como las causadas por la edad (Gómez-Pérez et al. 2011b) o la ingesta rica en grasas (Gómez-Pérez et al. 2012). En el mismo contexto, se ha visto que la funcionalidad del músculo esquelético resulta afectada por las hormonas sexuales tanto en machos como en hembras (Ramamani et al. 1999).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, nos propusimos el segundo objetivo, analizar el papel de las hormonas ováricas, especialmente del E2, en la función y biogénesis mitocondrial del músculo esquelético. Para ello utilizamos ratas Wistar ovariectomizadas a las 5 semanas de edad y sus correspondientes controles que fueron sacrificadas a las 14 semanas de edad. Las ratas ovariectomizadas se dividieron en dos grupos, que durante las 4 semanas previas al sacrificio se trataron uno con E2 (10µg/kg/48h disuelto en aceite de maíz), y el otro sólo con el vehículo. Todos los animales control se encontraban en fase de diestro en el momento del sacrificio. La administración de una dosis fisiológica de E2 permite investigar qué efectos de la ovariectomía serían revertidos por la acción de esta hormona. Para alcanzar el objetivo propuesto se determinaron parámetros biométricos y circulantes, así como marcadores de biogénesis y función mitocondrial en el músculo gastrocnemius. El estudio se complementó con una serie de experimentos con miotubos L6E9 que se trataron con E2, con Pg o con T.

El conocimiento de que la adiponectina no se sintetiza exclusivamente en el TAB, sino también en otros tejidos, incluyendo el músculo esquelético (Krause et al. 2008), nos llevó a ampliar nuestro objetivo para analizar si la

relación entre la funcionalidad mitocondrial y la expresión de adiponectina, previamente observada en el TAB, se da también en el músculo esquelético. Utilizando los mismos modelos experimentales de ratas ovariectomizadas y de miotubos, analizamos la expresión de adiponectina y de sus receptores específicos.

Los resultados obtenidos se recogen en el **capítulo 4.2**.

Como complemento a los estudios previos de dimorfismo sexual en el TAB, se ha planteado un estudio en el que se administra un tratamiento con Rsg. Los agonistas del PPAR γ , incluyendo la Rsg, son hipoglucemiantes orales que mejoran la sensibilidad a la insulina. Los mecanismos a través de los que actúan incluyen la inducción de la adipogénesis, que previene la lipotoxicidad, mitigación de la inflamación, regulación de la liberación de adipoquinas, inducción de la biogénesis mitocondrial y mejora de la función mitocondrial (Bogacka et al. 2005; Choo et al. 2006; Guilherme, et al. 2008; Lehrke y Lazar 2005; Rong, et al. 2007; Rosen y Spiegelman 2001; Scherer 2006; Wilson-Fritch, et al. 2003), todos ellos aspectos relacionados con los objetivos de investigación de nuestro grupo.

Para determinar si la respuesta de la función mitocondrial y la síntesis de adiponectina al tratamiento con Rsg es dependiente del sexo se utilizó un diseño experimental *in vivo* con ratas Wistar de ambos sexos de 6 semanas de edad. Tanto los machos como las hembras se dividieron en tres grupos experimentales (Control, HFD y HFD+Rsg) y se les alimentó durante 16 semanas, bien con una dieta estándar (grupo Control), o bien con una dieta rica en lípidos y sacarosa (grupos HFD). Durante las dos últimas semanas del tratamiento dietético, el grupo HFD+Rsg se suplementó con Rsg (100mg/kg dieta). Se llevó a cabo un control del ciclo estral para minimizar las diferencias entre las hembras, de modo que todas ellas se encontraban en diestro en el momento del sacrificio. Se analizaron los niveles de metabolitos y adipoquinas

circulantes, así como los marcadores de función, biogénesis y dinámica mitocondriales en el TAB gonadal. Estos estudios se complementaron con cultivos de células 3T3-L1 tratadas con Rsg o con antimicina, en las que se determinaron los marcadores de función mitocondrial y adipocinas determinados *in vivo*.

Los resultados obtenidos se recogen y discuten en el **capítulo 4.3**.

El trabajo presentado en esta tesis doctoral se ha realizado en el *Grup de Metabolisme Energètic i Nutrició del Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut de la Universitat de les Illes Balears*, grupo de investigación que es miembro del Centro de Investigaciones Biomédicas en Red de Fisiopatología de la obesidad y la nutrición (Ciberobn) del Instituto de Salud Carlos III y del Instituto de Investigación Sanitaria de Palma (IDISPA). Durante el desarrollo de esta tesis, la doctoranda ha disfrutado de una beca predoctoral concedida por la *Conselleria d'Educació, Cultura i Universitats del Govern de les Illes Balears*, tras ser seleccionada en el marco de un programa operativo cofinanciado por el Fondo Social Europeo. De igual forma, este trabajo ha sido posible gracias a los proyectos de investigación financiados por la Dirección General de Investigación y Gestión del Plan Nacional de I+D+i (SAF2010-21792), por el Fondo de Investigaciones Sanitarias (PI060293) del Gobierno Español, y por ayudas de la Comunidad Autónoma de las Islas Baleares y FEDER (31/2011 y AAEE002/2012).

Parte de los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral han sido recogidos en las siguientes publicaciones científicas:

- Capllonch-Amer G; Lladó I, Proenza AM, García-Palmer FJ, Gianotti M. **Opposite effects of 17-beta estradiol and testosterone on mitochondrial biogenesis and adiponectin synthesis in white adipocytes** *Journal of Molecular Endocrinology* (2014) 52, 203–214. DOI: 10.1530/JME-13-0201

- Capllonch-Amer G, Sbert-Roig M, Galmés-Pascual BM, Proenza AM, Lladó I, Gianotti M, García-Palmer FJ **Estradiol stimulates mitochondrial biogenesis and adiponectin synthesis in skeletal muscle** Journal of Endocrinology. En prensa DOI: 10.1530/JOE-14-0008

Además, durante la realización de la presente tesis, la doctoranda ha participado activamente en la elaboración de otros trabajos relacionados con el tema de la tesis que han dado lugar a la siguiente publicación:

- Gómez-Pérez Y, Capllonch-Amer G *et al.* **Long-term high-fat-diet feeding induces skeletal muscle mitochondrial biogenesis in rats in a sex-dependent and muscle-type specific manner** Nutrition and Metabolism (Lond) 2012. **9**(1):15 DOI: 10.1186/1743-7075-9-15



Materiales y métodos

3.1. ESTUDIOS *IN VIVO*

Los reactivos de uso general se adquirieron en Sigma Aldrich (St Louis, MO, EEUU) y en Panreac (Barcelona, España). La procedencia de los reactivos específicos se indica en cada caso.

3.1.1. Animales y tratamientos

Todas las manipulaciones en los animales se llevaron a cabo conforme a las directrices aprobadas por el comité ético de nuestra institución y por la UE (2010/63/UE). Los animales estaban estabulados a $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ con una humedad del $65\pm 3\%$ y un ciclo de 12 horas de luz/oscuridad con libre acceso al agua y al pienso. Todos los piensos fueron comprados a Panlab (Barcelona, España).

Experimento OVARIECTOMÍA

Se utilizaron ratas Wistar hembra, dos terceras partes de las cuales fueron ovariectomizadas a las 5 semanas de edad (Charles River Laboratories, Barcelona, España). Durante todo el experimento los animales fueron alimentados con pienso estándar (A04). A las 10 semanas de edad se organizaron tres grupos experimentales con animales de peso corporal similar: controles (n=6), ovariectomizadas (OVX) (n=6) y ovariectomizadas tratadas con E2 (OVX+E2) (n=6). El tratamiento con E2 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EEUU) se llevó a cabo administrando una inyección subcutánea de $10\mu\text{g}$ de E2 por kg de peso corporal cada 48 horas durante las cuatro semanas previas al sacrificio. Las OVX fueron tratadas del mismo modo pero administrándoles únicamente el vehículo en el que estaba disuelto el E2, aceite de maíz (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EEUU).

Experimento ROSIGLITAZONA

Tanto los machos como las hembras se dividieron en tres grupos de peso corporal similar: Control, HFD y HFD+Rsg. El grupo control fue alimentado con pienso estándar (Panlab, 210) durante toda la duración del experimento.

Los dos grupos HFD fueron alimentados durante 16 semanas con una dieta rica en grasas y en sacarosa (HFD) (Panlab, 235). Durante las últimas dos semanas, la dieta del grupo HFD+Rsg se suplementó con rosiglitazona (100mg/kg dieta). De este modo se obtuvieron seis grupos experimentales: Control machos, Control hembras, HFD machos, HFD hembras, HFD+Rsg machos y HFD+Rsg hembras. Cada dos semanas se procedió al control del peso corporal y de la ingesta. Sin embargo, durante las dos últimas semanas se aumentó la frecuencia, realizando el control cada dos días.

3.1.2. Sacrificio y obtención de las muestras

Para certificar que en el momento del sacrificio todas las hembras no ovariectomizadas estaban en la misma fase del ciclo estral (diestro) se les realizaron controles rutinarios mediante frotis vaginales y medición de la impedancia (Impeast, Cibertec, Madrid, España). El sacrificio se llevó a cabo por decapitación. La sangre se recogió inmediatamente y se mantuvo a temperatura ambiente durante 20 minutos para permitir la formación del coágulo, tras lo que se centrifugó 20 minutos a 1000g para obtener el suero. Un pequeño volumen del suero sanguíneo obtenido se utilizó de inmediato para la determinación de la capacidad antioxidante total y el resto fue alicuotado y almacenado a -20°C para posteriores determinaciones.

Experimento OVARIECTOMÍA

El sacrificio se efectuó tras un periodo de ayuno de 12 horas. El músculo gastrocnemius se extrajo, se pesó, se separó la fracción roja de la blanca y de esta última se reservaron dos porciones para aislamiento de miofibras y preparación histológica. El resto del gastrocnemius así como los demás tejidos de interés fueron limpiados, congelados en nitrógeno líquido y a continuación se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

Experimento ROSIGLITAZONA

El sacrificio se llevó a cabo sin período de ayuno previo. El tejido adiposo blanco (TAB) gonadal y los demás tejidos de interés se extrajeron, se pesaron, se limpiaron y se congelaron a -80 °C hasta su análisis.

3.1.3. Determinación de parámetros circulantes

La medición de la capacidad antioxidante total se realizó con un kit colorimétrico, TAC Assay Kit (BioVision Research products, EEUU). La base del mismo es la representación de la absorbancia de la muestra frente a un estándar de Trolox. Para la determinación del E2 y de la progesterona circulantes se utilizaron kits comerciales basados en la técnica ELISA de inmunodetección (DRG Instruments, Marburg, Alemania). El mismo método se utilizó para la medición de la adiponectina y la leptina (Millipore, MA, EEUU), así como para la resistina (USCNK, Houston, EEUU). Los NEFA se determinaron mediante un kit colorimétrico (Wako Chemicals GmbH, Alemania).

3.1.4. Procesamiento de las muestras

Las muestras utilizadas fueron musculo esquelético gastrocnemius blanco para el experimento OVARECTOMÍA, y TAB gonadal en el caso del experimento ROSIGLITAZONA.

Preparación de homogenados

Se prepararon los homogenados en un tampón compuesto por: 250mM sacarosa, 2mM EGTA, 40mM KCl, 20mM Tris, pH7.4. Del homogenado obtenido, una alícuota se utilizó de forma inmediata para la determinación de actividades enzimáticas. Otra alícuota se congeló a -20°C con inhibidores de proteasas y fosfatasas (0.2mM ortovanadato sódico, 1mM PMSF, 10µM pepstatina, 10µM leupeptina) para posteriores determinaciones.

El procedimiento utilizado fue diferente en función del tejido homogenizado:

- Una porción de músculo esquelético (gastrocnemius blanco) se limpió de tejido conectivo y se introdujo en el tampón de homogenización en una proporción 1:10 (peso:volumen). Se desmenuzó con unas tijeras de relojero y se homogenizó con un dispersor (IKA T10 basic ULTRA-TURAX®). Posteriormente se sonicó 2 veces con una potencia de 20W dejando un intervalo de enfriamiento de 85 segundos entre ambos pulsos. La muestra se centrifugó a 600 x g, 10 minutos a 4°C.
- Una porción de TAB gonadal se limpió y se introdujo en el tampón de homogenización en una proporción 3:10 (peso:volumen). Se desmenuzó con unas tijeras de relojero y se homogenizó con un dispersor (IKA T10 basic ULTRA-TURAX®). Posteriormente se centrifugó 15 minutos a 500 x g a 4°C para eliminar el exceso de grasa.

Obtención del ARN

El tejido (muscular o adiposo) se homogenizó en una proporción 1:10 con TriPure® *Isolation Reagent* (Roche Diagnostics, Basel, Suiza) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este reactivo rompe la célula y desnaturaliza las nucleasas endógenas, preservando así la integridad de los ácidos nucleicos de la muestra. El ARN se obtuvo de la fase acuosa a través de la precipitación con isopropanol. Se limpió, se resuspendió en agua libre de ARNasas, se cuantificó mediante el uso del Nanodrop (BioTek, Winooski, Vermont, EEUU) y se almacenó a -80°C para su posterior utilización.

Obtención del ADN

Se disgregaron 50mg de TAB gonadal con ayuda de unas tijeras de relojero y se obtuvo el ADN usando un kit de extracción y purificación (High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). Se siguieron las instrucciones del fabricante sin modificaciones. El ADN

resultante se cuantificó mediante el Nanodrop (BioTek, Winooski, Vermont, EEUU) y se almacenó a -80°C para su posterior utilización.

Obtención y permeabilización de miofibras de gastrocnemius blanco

El protocolo de obtención y permeabilización de miofibras es una modificación del protocolo original de Burelle (Burelle and Hochachka 2002). En primer lugar, se obtuvo una porción de gastrocnemius blanco de aproximadamente 5mm de anchura y altura y se depositó en solución A preenfriada a 4°C (2.77mM CaK_2EGTA , 7.23mM K_2EGTA , 6.56mM MgCl_2 , 0.5mM ditioneitol (DTT), 50mM K-MES, 20mM imidazol, 20mM taurina, 5.3mM Na_2ATP , 15mM fosfocreatina, pH 7.3 a 4°C). Con ayuda de una lupa, pinzas y bisturí se limpió de tejido conectivo y grasa. Una vez limpio, se utilizaron dos agujas finas con mango para separar las miofibras unas de otras. Finalmente, se pesó la cantidad adecuada para cada determinación y las diferentes alícuotas se depositaron en tubos de polipropileno (conocidos comúnmente como tubos eppendorf, así se denominarán a partir de ahora) con 1.5mL de solución A suplementada con saponina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 30 minutos a 4°C . Tras el proceso de permeabilización se cambiaron las miofibras de tubo eppendorf y se llevaron a cabo tres lavados de 10 minutos a 4°C en rotación con 1.5mL de la solución B (2.77mM CaK_2EGTA , 7.23mM K_2EGTA , 1.38mM MgCl_2 , 3.0mM K_2HPO_4 , 0.5mM DTT, 20mM imidazol, 100mM K-MES, 20mM taurina, pH 7.3 at 4°C) suplementada con BSA libre de ácidos grasos (2mg/mL). Finalmente, se reemplazó la solución B y las miofibras se mantuvieron en hielo hasta el momento del análisis, no más de 4 horas después.

La calidad de las preparaciones, concretamente el mantenimiento de la integridad de la membrana mitocondrial externa, se evaluó para una muestra de cada proceso de permeabilización mediante el test del citocromo C (Saks, et al. 1998). Este test se fundamenta en que en el medio de ensayo, el

citocromo C se disocia de la cara externa de la membrana mitocondrial interna. Si la membrana externa está dañada, este citocromo C sale del espacio intermembrana mitocondrial disminuyendo la tasa de respiración. Bajo estas condiciones, la adición de citocromo C oxidado exógeno restablecerá completamente la respiración. Para ello se midió el consumo de oxígeno basal de 10mg de miofibras en 500 μ L de solución de KCl (125mM KCl, 20mM Hepes, 4mM glutamato, 2mM malato, 3mM MgCl₂, 5mM KH₂PO₄, 0.3mM DTT, pH 7.1, 25°C) mediante un electrodo tipo Clark (ver apartado 7.3.1). Posteriormente se registró el descenso del consumo de oxígeno adicionando de forma secuencial ADP 1mM y citocromo c oxidado 8 μ M.

3.2. ESTUDIOS *IN VITRO*

Los reactivos de uso general se adquirieron en Sigma Aldrich (St Louis, MO, EEUU) y en Panreac (Barcelona, España). La procedencia de los reactivos específicos se indica en cada caso.

3.2.1. Modelos de estudio *in vitro* utilizados

Adipocitos blancos 3T3-L1

La línea celular 3T3-L1 (ATCC, American Type Culture Collection) fue aislada de embriones de 17-19 días de ratón albino suizo disgregados y está compuesta por preadipocitos de tejido adiposo blanco que se diferencian a adipocitos con el protocolo adecuado. Durante su proliferación muestran una morfología fibroblástica, y la inducción de la diferenciación desencadena cambios profundos en el fenotipo de los preadipocitos, adoptando una morfología esférica y generando vesículas lipídicas, mostrando por tanto muchas de las características bioquímicas y morfológicas de los adipocitos diferenciados *in vivo* (Armani, et al. 2010). Curiosamente, durante su desarrollo, los adipocitos jóvenes muestran múltiples gotículas lipídicas, que se unen para formar una única cuando la célula madura (Fonseca-Alaniz, et al. 2007). Al ser una línea clonal, la 3T3-L1 es homogénea en términos de población celular, lo que permite una respuesta homogénea a los tratamientos (Moreno-Navarrete 2012). Además, estas células pueden pasarse indefinidamente, lo que proporciona una fuente fiable de preadipocitos para los estudios. Por todas estas razones, este modelo celular es una útil herramienta complementaria a los estudios con animales.

Miocitos L6E9

La diferenciación terminal de las líneas de mioblastos se caracteriza por la fusión celular para formar miotubos multinucleados, cese de la síntesis de ADN con retirada irreversible del ciclo celular y producción de proteínas específicas de músculo (Nadal-Ginard 1978). La línea celular L6E9 (subclón

de la línea celular L6) es una línea celular inmortalizada cuyo proceso miogénico recapitula las fases de la diferenciación muscular embrionaria, donde los mioblastos experimentan alineamiento, fusión y crecimiento en el intento de formar una miofibra contráctil. La ventaja que presenta la línea celular L6E9 frente a las otras líneas habituales, como las L6 o las C2C12, radica en la formación más robusta de miotubos derivada de una deficiencia en miostatina (Rossi, et al. 2010). La línea L6E9 ha proporcionado un modelo homogéneo y estable en el que estudiar los efectos de los tratamientos en el músculo esquelético. La línea L6E9 utilizada fue cedida por el Dr. Zorzano, del Instituto de Investigación Biomédica de Barcelona (España).

3.2.2. Materiales

El suero bovino fetal (FBS), el FBS tratado con carbón activo, la mezcla de antibióticos utilizada (penicilina-estreptomicina, P-S) y la solución de disociación se compraron en Biological Industries (Beit-Haemek, Israel). Todos los medios de cultivo (medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco, DMEM) se obtuvieron de Gibco (Gibco® by Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU). Las placas de cultivo son de la marca Corning (Corning Incorporated, NY, EEUU). Los reactivos utilizados para los tratamientos se compraron a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EEUU). El resto de proveedores se detallan a lo largo del texto.

3.2.3. Protocolo de mantenimiento y diferenciación de adipocitos blancos 3T3-L1

Los medios de cultivo utilizados con las 3T3-L1 son los siguientes:

- DMEM (+) rojo fenol, (+) L-glutamina, Hepes 25mM, glucosa 4.5g/L. Suplementado con 10% FBS, 1% P-S. A partir de ahora se identificará en el texto como “DMEM completo”.

- DMEM (-) rojo fenol, (+) L-glutamina, Hepes 25mM, glucosa 4.5g/L. Suplementado con 10% FBS tratado con carbón activo, 1% P-S. A partir de ahora se identificará en el texto como “DMEM sin rojo fenol”.

Las 3T3-L1 se mantuvieron de forma rutinaria a 37°C en una atmósfera húmeda con el 5% de CO₂ en un medio de cultivo DMEM completo. El medio de cultivo se cambió 2-3 veces por semana durante el mantenimiento de las células. Para la diferenciación se llevaron las placas a una confluencia del 100%. Tras dos días confluentes se indujo la diferenciación con el mismo medio suplementado con dexametasona 0.25µM, IBMX 0.5mM e insulina 5µM durante dos días, y dos días más con suplementación únicamente de insulina 5µM. A esto le siguieron tres días en medio de mantenimiento que se cambió por medio DMEM sin rojo fenol 24 horas antes de los tratamientos.

3.2.4. Protocolo de mantenimiento y diferenciación de miocitos L6E9

Los medios de cultivo utilizados con las L6E9 son los siguientes:

- DMEM completo.
- DMEM (+) rojo fenol, (+) L-glutamina, Hepes 25mM, glucosa 4.5g/L. Suplementado con 2% FBS, 1% P-S. A partir de ahora se identificará en el texto como “DMEM con rojo fenol restringido en suero”.
- DMEM (-) rojo fenol, (+) L-glutamina, Hepes 25mM, glucosa 4.5g/L. Suplementado con 2% FBS tratado con carbón activo, 1% P-S. A partir de ahora se identificará en el texto como “DMEM sin rojo fenol restringido en suero”.

Las L6E9 se mantuvieron de forma rutinaria a 37°C en una atmósfera húmeda con el 5% de CO₂ en un medio de cultivo DMEM con rojo fenol. El medio de cultivo se cambió 2-3 veces por semana durante el mantenimiento de las células. En el momento de la diferenciación se alcanzó un 70% de confluencia

en la placa y el medio se cambió por el DMEM con rojo fenol restringido en suero. Tras 5 días de diferenciación y 24 horas antes del tratamiento se sustituyó por DMEM sin rojo fenol restringido en suero.

3.2.5. Tratamientos

Todos los tratamientos dados a las células se prepararon en el medio sin rojo fenol para evitar interferencias de este compuesto y de los compuestos lipídicos del suero con el tratamiento. En el caso de las L6E9 el medio seguía restringido en suero. Todos los tratamientos de las 3T3-L1 se aplicaron durante 24 horas, y para las L6E9 se realizaron los tratamientos a las 18 horas para el análisis de expresión génica y a las 24 horas para la tinción de la masa mitocondrial. Los tratamientos dados y sus concentraciones están detallados en la Tabla 2.

Tabla 2.- Tratamientos aplicados a las líneas celulares

Compuesto	Concentración	Línea celular
17beta-estradiol (E2)	10nm	3T3-L1 / L6E9
Progesterona (Pg)	1µM	3T3-L1 / L6E9
Testosterona (T)	1µM	3T3-L1 / L6E9
Pg+E2	1µM+1µM	3T3-L1
T+E2	1µM+1µM	3T3-L1
Flutamida (FLT)	10 µM	3T3-L1
FLT+Pg	10 µM+1µM	3T3-L1
FLT+T	10 µM+1µM	3T3-L1
Rosiglitazona (Rsg)	15µM	3T3-L1
Antimicina (Am)	18 µM	3T3-L1

3.2.6. Procedimientos generales de cultivos celulares

Reactivación

La reactivación de una línea celular es un proceso delicado, ya que el DMSO que se utiliza como crioprotector es tóxico y por tanto se debe diluir rápidamente. Además hay que llevar a las células a 37°C de forma rápida para que sea lo menos traumático posible. Para ello se usó un tubo de polipropileno de 15mL con 13mL de DMEM completo atemperado a 37°C.

Se introdujo 1mL de este medio en el criovial con la solución de células aún congelada, se aspiró todo el volumen de líquido y se introdujo de nuevo en el tubo con medio nuevo. El proceso se repitió todas las veces necesarias para recoger el contenido completo del criovial. Finalmente se centrifugó a 260g, 5 minutos, se aspiró el medio y se resuspendió el precipitado celular en 1mL de medio completo, que se pasó a la placa deseada y se completó con el volumen de medio apropiado.

Pase

Se aspiró el medio de la placa y se realizó un lavado con PBS pH 7.4 para eliminar cualquier resto de componentes del suero que pudieran inhibir la tripsina. Se añadió el volumen de solución de disociación (Trypsin EDTA *Cell Dissociation Solution A* 0.25%, EDTA 0.02%) adecuado para cada placa y se incubó 2 minutos a 37°C. Pasado este tiempo se observó la placa al microscopio para determinar el grado de disociación de las células, y en caso de que aún no estuvieran lo suficientemente separadas se incubó de nuevo hasta que todas las células estuvieron en suspensión. Se inactivó la tripsina con medio completo (se añadió tres veces el volumen de solución de disociación utilizado) y se pasaron las células por la pipeta varias veces para acabar de disgregarlas. Se depositó en una placa el volumen de la suspensión deseado y se completó hasta el volumen necesario con medio completo. En caso necesario, se contaron las células utilizando una cámara de Neubauer. Para el conteo de células viables se usó un colorante vital (Trypan blue, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU).

Congelación

El medio de congelación utilizado fue el recomendado por el proveedor, DMEM completo suplementado con DMSO 5%. Las células se desanclaron de la placa como se ha descrito previamente, se centrifugó la suspensión a 260 x g durante 5 minutos y se resuspendió el precipitado en medio de

congelación. Rápidamente se introdujo en los crioviales y éstos en un contenedor de congelación (Nalgene™ Cryo 1°C *freezing container*, “Mr. Frosty”) a -80°C. El objetivo del contenedor de congelación es controlar la bajada de temperatura manteniendo la tasa reproducible de -1°C/minuto que se sabe que es la crítica para una óptima criopreservación y recuperación de las células. Tras 24 horas se sacaron los crioviales del congelador y se conservaron en atmósfera de nitrógeno hasta el momento de su uso.

3.2.7. Recogida de las células y procesamiento

Obtención del material génico y proteínas purificadas

Una vez retirado y conservado el medio de cada placa, la recogida de las células se realizó con el reactivo TriPure® *Isolation Reagent* (Roche Diagnostics, Basel, Suiza) siguiendo las instrucciones del fabricante (1mL de reactivo en cada pocillo de placas p6). Tanto el material génico como las proteínas purificadas se cuantificaron mediante la placa para microvolúmenes Take3 del lector espectrofotométrico Powerwave XS (BioTek, Winooski, Vermont, EEUU) usando el software de análisis asociado, el Gen5. El ARN se almacenó a -80°C hasta su utilización. El ADN y las proteínas a -20°C.

Recogida para actividades enzimáticas

Para las actividades enzimáticas, se eliminó el medio de cultivo, se hizo un lavado con PBS y se lisaron las células con 600µL de agua por cada pocillo p6. Se separaron las células mediante un *scraper* y el lisado se favoreció aspirando repetidamente con la pipeta y mediante sonicación (20W). Finalmente se centrifugó a 500 x g durante 5 minutos para eliminar los restos de membrana. El sobrenadante se utilizó inmediatamente para las determinaciones.

Recogida para inmunoblot

Para realizar inmunoblot, las células se recogieron en un tampón de lisis (50mM Tris pH 8.8., 1mM EGTA, 1% Igepal) suplementado con 10mM

iodoacetamida y antiproteasas y antifosfatasas (1mM leupeptina, 1mM pepstatina, 1mM ortovanadato sódico) con ayuda de un *scraper*. La solución se incubó 1 hora a 4°C con agitación fuerte y posteriormente se centrifugo a 15000 x g, 30 minutos a 4°C. Se recogió el sobrenadante, se determinó el contenido proteico mediante el método de ácido bicinconínico mediante un kit comercial (BCA protein assay kit, Pierce, Bonn, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante y se almacenó a -20°C hasta su utilización.

3.2.8. Análisis de la viabilidad celular

La muerte celular debida a la citotoxicidad de los tratamientos se evalúa clásicamente mediante la cuantificación del daño en la membrana plasmática (Korzeniewski and Callewaert 1983). La lactato deshidrogenasa (LDH) es un enzima estable presente en todos los tipos celulares que se libera rápidamente al medio en caso de daño de esta membrana. Para cuantificarlo se usó un kit colorimétrico (LDH Cytotoxicity Assay Kit II, Biovision Inc., San Francisco, EEUU). Se sembró una placa p12 de cada tipo celular en la que se aplicaron los tratamientos hormonales. Para la determinación se siguieron las instrucciones del fabricante.

3.3. METODOLOGÍA GENERAL

Los reactivos de uso general se adquirieron en Sigma Aldrich (St Louis, MO, EEUU) y en Panreac (Barcelona, España). La procedencia de los reactivos específicos se indica en cada caso.

3.3.1. Determinación del consumo de oxígeno de las miofibras permeabilizadas

El consumo de oxígeno de las mitocondrias en las miofibras permeabilizadas se midió polarográficamente con un electrodo de Clark. Para ello, 10mg de miofibras en 500 μ L de solución B suplementada con BSA libre de ácidos grasos (ver apartado 3.1.4) se incubaron a 37°C en una cámara termostática con un electrodo de oxígeno tipo Clark (Oxygraph; Hansatech, Norfolk, UK). Los sustratos de interés se añadieron de forma secuencial y se registró el descenso de la concentración de oxígeno en la cámara con cada uno de ellos. Se realizaron dos carreras con diferentes sustratos para cada animal: carrera A, glutamato/malato (5/2.5mM), ADP (2mM), rotenona/succinato (1 μ M/10mM); carrera B, palmitoil-carnitina/malato (10/5mM), ADP (2mM). Finalmente las miofibras se recuperaron y se almacenaron en 500 μ L de tampón STE (sacarosa 250mM, EGTA 2mM, Tris HCL 50mM, pH 7.4) a -20°C para posteriores determinaciones.

3.3.2. Determinación de la producción de radicales libres en las miofibras permeabilizadas

Para la medición de la producción de radicales libres se utilizó el reactivo Amplex® Red (10-acetyl-3,7-dihidrofenoxantina) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU). En presencia de peroxidasa este reactivo reacciona con el H₂O₂ con una estequiometría 1:1 generando un producto de oxidación rojizo fluorescente, la resorufina, con una excitación y emisión máximas de 571nm y 585nm respectivamente. Dado su elevado coeficiente de extinción

($58000 \pm 5000 \text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$) se puede detectar fluorométricamente o espectrofotométricamente. En nuestro caso el ensayo se realizó por fluorimetría para optimizar la sensibilidad. Tras el ensayo las miofibras se recuperaron y se almacenaron a -20°C en $500\mu\text{L}$ de tampón STE.

Reactivos

- Tampón de respiración: K-MES 110mM, KCl 35mM, EGTA 1mM, MgCl_2 3mM, K_2HPO_4 10mM, pH 7.1. En el momento de usarlo se debe suplementar con 5mg/mL de BSA.
- Amplex® Red en DMSO, 10mM
- Peroxidasa de rábano (HRP) en agua bidestilada, 10U/mL
- Glucosa oxidasa en agua bidestilada, 0.04U/mL
- Beta-D-(+)-glucosa en agua bidestilada, 280mM

Preparación del patrón

La glucosa oxidasa produce H_2O_2 a partir de la beta-D-(+)-glucosa y, sabiendo que en las condiciones de trabajo $1\mu\text{L}$ de glucosa oxidasa produce 1.52pmol de H_2O_2 por minuto, puede usarse para crear una recta patrón.

La glucosa oxidasa 0.04U/mL se diluyó 1/1000 en agua bidestilada antes de la reacción, y el patrón se preparó en los pocillos de la siguiente manera:

Punto del patrón	1	2	3	4	5	6
μL de tampón de respiración	45	40	35	30	25	20
μL de glucosa oxidasa diluida	5	10	15	20	25	30

Preparación de las muestras e inicio de la reacción

En cada pocillo de muestra se introdujeron $50\mu\text{L}$ de tampón de respiración y 4mg de miofibras permeabilizadas. A continuación, se añadieron en todos los pocillos (incluso en los del patrón) $50\mu\text{L}$ de la solución de trabajo de Amplex® Red ($50\mu\text{L}$ de Amplex® Red 10mM, $100\mu\text{L}$ de HRP 10U/mL y 4.85mL de tampón de respiración) y se incubaron 5 minutos a 37°C .

Finalmente se adicionaron 5 μ L de sustrato y se llevó a cabo la medición a 587nm durante 1 hora.

Los sustratos utilizados fueron: glutamato/malato (5/2.5 mM) y palmitoil-carnitina/malato (10/5mM) para las muestras y beta-D-(+)-glucosa 280mM para el patrón.

Cálculos

La pendiente de cada reacción del patrón se representó respecto a la concentración de glucosa oxidasa (que es equivalente a la producción de H₂O₂ por minuto). La pendiente de la recta patrón final (sin tener en cuenta el punto de inicio) es la que se utilizó posteriormente para determinar la concentración de H₂O₂ de las muestras.

3.3.3. Determinación de la composición tisular

3.3.3.1. Proteínas

Método de Bradford

Las proteínas en el tejido muscular se determinaron mediante el método de Bradford (Bradford 1976), basado en la unión del colorante Coomasie Brilliant Blue G-250 con las proteínas. Dicha interacción crea un complejo con absorción máxima a 465-595nm, por lo que se puede medir espectrofotométricamente.

Preparación de reactivos:

Reactivo de Bradford: Se mezclaron 50mL de etanol 96% con 100mg Coomasie brillant blue G-250 y se agitó bien. Se añadieron 600mL de H₂O bidestilada sin dejar de agitar, y por último se incorporaron 100mL de H₃PO₄ al 85% y se enrasó a 1L con H₂O bidestilada.

Patrón de proteínas: Se realizó un banco de diluciones a partir de una disolución madre de BSA 0.05% disuelto en el mismo tampón que la muestra de la siguiente forma:

μL de BSA	0	1	2	3	4	5
μL de tampón de la muestra	10	9	8	7	6	5
μL de reactivo de Bradford	300	300	300	300	300	300

Procedimiento

En una placa de 96 pocillos para espectrofotometría se introdujeron 10μL de una dilución apropiada de la muestra hecha en el mismo tampón en que estaba homogeneizada y 300μL de reactivo de Bradford. Cada muestra precisó una dilución diferente, en el caso del músculo esquelético se realizó dilución 1/20. Paralelamente se cargó el patrón y se leyó a 540nm.

Método de Lowry

El método de Lowry (Lowry, et al. 1951) adaptado a microplaca se utilizó para la determinación de las proteínas en el TAB. El ion Cu^{+2} acomplejado con el tartrato Na/K es capaz de fijarse, por la reacción de Biuret, a las parejas de enlaces peptídicos consecutivos de las proteínas, dando lugar a una coloración violácea. Este conjunto reacciona con el reactivo de Folin-Ciocalteau, dando un color más azulado debido al complejo reductor Cu-proteína. Por otra parte, el fosfomolibdato se reduce en medio básico al reaccionar con los restos tirosinil de las cadenas polipeptídicas, dando un color azul.

Preparación de reactivos

Reactivo 1) 2% Na_2CO_3 en 0.1N NaOH

Reactivo 2) 2% Tartrato Na/K en H_2O bidestilada

Reactivo 3) 1% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en H_2O bidestilada

NaOH 0.75N

Reactivo de Folin-Ciocalteau

BSA cristalizado

Procedimiento

Se preparó el reactivo A uniendo en este orden el reactivo 1, el reactivo 2 y el reactivo 3 en la proporción 100:1:1. Es importante mantener este orden y agitar constantemente para evitar la precipitación de los componentes. El reactivo de Folin se diluyó 1:1 en H₂O bidestilada.

Para llevar a cabo la reacción se añadió la muestra y se llevó hasta un volumen final de 40 μ L con el tampón en el que estaba preparada la misma. Se añadieron 10 μ L de NaOH 0.75N y 250 μ L del reactivo A. Se mezcló bien y se dejó reposar durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 25 μ L de reactivo de Folin diluido de forma rápida, se mezcló de nuevo y se incubó 30 minutos. Se realizó la lectura a 700nm.

El patrón se preparó a partir de una disolución de BSA en el tampón en el que estaban las muestras tal y como está especificado a continuación y se procesó del mismo modo exacto que las mismas.

μ L BSA 0.1%	0	2	4	6	8	10
μ g BSA	0	2	4	6	8	10
μ L tampón de homogenización ($V_f=40\mu$ L)	40	38	36	34	32	30
μ L NaOH 0.75N	10	10	10	10	10	10

El rango de concentraciones de BSA adecuado se debe determinar para las condiciones de la determinación, de manera que se mantenga una relación lineal entre absorbancia y concentración.

3.3.3.2. Ácido desoxirribonucleico

Para la determinación del ADN contenido en el homogenado se usó el método del ácido diaminobenzoico (DABA) (Thomas and Farquhar 1978) adaptado a microplaca. Este método se basa en la capacidad del DABA para reaccionar con los desoxirribonucleótidos en medio básico, formando aductos fluorescentes estables en medio ácido.

Reactivos

- DABA 1.2M en agua bidestilada (preparado inmediatamente antes de la determinación)
- HCl 1N
- Patrón de ADN: se preparó un banco de diluciones a partir de una disolución madre de esperma de arenque (Sigma, D-6898) con una concentración de 25-30ng/ μ L (fue de 28.14ng/ μ L en este caso)

Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8
μ L de disolución madre de ADN	0	25	50	75	100	150	175	200
μ L de agua bidestilada	200	175	150	125	100	50	25	0

Procedimiento

Se prepararon tantos tubos eppendorf como muestras había (incluyendo el patrón) por duplicado. Para la determinación de ADN en músculo esquelético se pipetearon 60 μ L de homogenado y se llevaron a un volumen final de 200 μ L con agua bidestilada. A continuación se añadieron 50 μ L de DABA recién preparado, se agitaron todos los tubos y se incubó a 60°C, 1 hora. Transcurrido este tiempo se enfriaron rápidamente las muestras introduciéndolas en hielo y se añadieron 1mL de HCl para estabilizar la reacción. Finalmente se agitaron las muestras y se transfirieron 300 μ L de cada tubo a un pocillo de placa de fluorimetría. Se realizó la lectura en el fluorímetro fijando las siguientes condiciones: $\lambda_{excitación}$: 360/60nm, $\lambda_{emisión}$: 528/20nm. Al usar placas de plástico, la lectura se realizó por arriba con una sensibilidad del 70%.

3.3.3.3. Triacilglicéridos

La concentración de TAG se midió espectrofotométricamente usando un kit comercial de Spinreact (Girona, España). La base del kit es la reacción de los TAG con agua a través de la lipoproteína lipasa (LPL) liberando glicerol, el cual es fosforilado por la glicerol quinasa (GK) generando glicerol-3-fosfato

(G3P) y ADP. El G3P es entonces convertido a dihidroxiacetona fosfato (DAP) y peróxido de hidrógeno, el cual reacciona con 4-aminofenazona y p-clorofenol mediante la peroxidasa generando H₂O y quinona, que da a la muestra una coloración rojiza medible espectrofotométricamente y que es proporcional a la concentración de triacilglicéridos presentes en la muestra (Fossati y Prencipe 1982).

Para ello, 30µL del homogenado de músculo esquelético y 970µL de reactivo se introdujeron en una cubeta semimicro de plástico y se incubaron a 37°C durante 5 minutos. Posteriormente se leyó la absorbancia a 505nm. Con el estándar proporcionado por el kit se procedió del mismo modo, usando en este caso 10µL de estándar y 1000µL de reactivo. Los cálculos finales se realizaron según la fórmula: (Absorbancia muestra/Absorbancia patrón) x Concentración estándar = mg/dL de de la muestra.

3.3.4. Test de tolerancia a la glucosa

El test de tolerancia a la glucosa se realizó en las ratas del experimento de ROSIGLITAZONA una semana antes del sacrificio. Tras un ayuno de 12 horas, se les inyectó glucosa por vía intraperitoneal (2g/kg peso corporal). Se tomó sangre de la vena safena antes de la inyección y 15, 30, 60 y 120 minutos después de la misma, y se analizó la concentración de glucosa mediante el sistema Accutrend (Roche Diagnostics, Basel, Suiza).

3.3.5. Determinación del contenido de cardiolipina

Para la determinación de cardiolipina en cultivos celulares se utilizó el marcaje con naranja de acridina (NAO) y la captación fluorimétrica. Para ello se sembraron las células en una placa adecuada para la lectura fluorimétrica y se sustituyó el medio de cultivo por 100µl de PBS con glucosa 20mM con NAO 250nM. Se incubó 30 minutos en las condiciones habituales en oscuridad y se

leyó posteriormente en con una longitud de onda de excitación de 485nm y de emisión de 528nm.

3.3.6. Determinación semicuantitativa de los niveles de proteínas.

Western blot

La técnica del Western-blot, o inmunoblot, se basa en la separación de las proteínas por su peso molecular mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida y condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y en su posterior inmovilización en una membrana por electrotransferencia para realizar finalmente un positivado inmunológico con dos anticuerpos específicos.

Tabla 3.- Volúmenes de reactivo necesarios para preparar los geles de acrilamida según la concentración final deseada.

Gel concentrador (Stacking)	5%		
Tris-SDS pH 6.8	4.5mL		
Acrilamida 30%	1.5mL		
H ₂ O bidestilada	3mL		
PSA 10%	100µL		
TEMED	10µL		
Gel separador (Resolving)	10%	12%	15%
Tris-SDS pH 8.8	4.5mL	4.5mL	4.5mL
Acrilamida 30%	3mL	3.6mL	4.5mL
H ₂ O bidestilada	1'5mL	0.9mL	0mL
PSA 10%	100µL	100µL	100µL
TEMED	10µL	10µL	10µL

Reactivos

- _ Tampón de carga: Tris-HCl 0.25M, SDS 10% (p/v), Glicerol 40% (v/v), Azul de bromofenol 0.1% (p/v). En el momento de su utilización se le añadió 2-mercaptoetanol (100µL/mL de tampón)
- _ Tampón de electroforesis 1x: Se preparó diluyendo el tampón Tris/Glycina/SDS 10x (BioRad #161-0772) con agua destilada.
- _ Geles de poliacrilamida. Se prepararon utilizando los volúmenes especificados en la Tabla 3.
- _ PBS-T: tampón fosfato salino con Tween-20 (1g/L)

- _ Solución de bloqueo: Leche en polvo desgrasada al 5% (p/v) en PBS-T
- _ Solución de anticuerpo primario: BSA 1%, azida sódica 0.05% en PBS-T. Con el anticuerpo de interés en la dilución deseada
- _ Solución de anticuerpo secundario: Leche en polvo desgrasada al 1% en PBS-T. Con el anticuerpo de interés en la dilución deseada

Tabla 4.- Relación de anticuerpos primarios utilizados en las diferentes muestras analizadas y condiciones.

	Anticuerpo	Casa comercial	PM (kDa)	Dilución, tiempo de incubación y cantidad de muestra
Gastrocnemius blanco	Actina	SCBT	42	1:500, 2h, 15µg prt
	Adiponectina	Abcam	27	1:500, 2h, 15µg prt
	AdipoR1	AlphaDiagnostics	49	1:1000, 1h, 15µg prt
	COX4	MitoScience	16	1:500, 1h, 15µg prt
	DRP1	SCBT	80	1:500 o/n, 15µg prt
	MFN1	SCBT	86	1:500 o/n, 15µg prt
	MFN2	SCBT	80-86	1:500 o/n, 15µg prt
	OPA1	SCBT	120	1:500 o/n, 15µg prt
	UCP3	SCBT	30	1:1000 o/n, 30µg prt
3T3-L1	Adiponectina	Abcam	27	1:1000, o/n, 30µg prt
	ER a	SCBT	66	1:200, o/n, 100µg prt
	ER b	SCBT	56	1:200, o/n, 50µg p prt
	Tubulina	SCBT	50	1:1000, o/n, 30µg prt
Medio	Adiponectina	Abcam	27	1:1000, 2h, 40µl
	BSA	SCBT	66	1:1000, 2h, 40µl

PM, peso molecular; SCBT, Santa Cruz Biotechnology; AdipoR1, receptor de adiponectina 1; COX4, citocromo c oxidasa subunidad 4; DRP1, proteína relacionada con la dinamina 1; MFN1 y 2, mitofusinas 1 y 2; OPA1, proteína de atrofia óptica 1; UCP3, proteína desacoplante 2; ER a y b, receptores de estrógenos alfa y beta; BSA, albúmina de suero bovino; o/n, *overnight*; prt, proteína.

Procedimiento experimental

Se preparó el volumen de muestra adecuado a la cantidad de proteína que se debía cargar y se añadió tampón de carga en proporción 3:1 (muestra:tampón). Se preparó el gel con el porcentaje de acrilamida adecuado para resolver correctamente la proteína a identificar, se cargó la muestra y se corrió la electroforesis 45 minutos a 200V. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa mediante un sistema de transferencia (Trans-Blot Turbo System, BioRad) y se procedió al bloqueo y la inmunodetección. El bloqueo y la incubación con el anticuerpo primario variaron en tiempo según la proteína de interés. Los anticuerpos primarios utilizados así como las condiciones se encuentran detallados en la Tabla 4. Tras la incubación con el Ac primario se realizaron tres lavados con PBS-T de 15-5-5 minutos respectivamente, y tras la incubación de una hora con el Ac secundario se realizaron dos lavados de 15 y 5 minutos con PBS-T y un último lavado de 5 minutos con PBS sin Tween, ya que este puede inhibir los reactivos de detección. La detección se realizó mediante un kit comercial bioluminiscente (Immunostar Western Chemiluminescence kit, BioRad) y la captación a través de un captador Chemidoc XRS (BioRad, CA, EEUU) y de su software de análisis asociado Quantity One (BioRad, CA, EEUU).

3.3.7. Determinación del daño oxidativo*Daño oxidativo en proteínas*

Una de las modificaciones que los ROS pueden provocar en las proteínas es la formación de grupos carbonilo, una modificación irreversible asociada con la pérdida de la función proteica. Estos derivados son químicamente estables y sirven como marcadores del estrés oxidativo (Levine, et al. 1990). El fundamento de la técnica es la conjugación de dichos grupos con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), lo que permite su inmunodetección mediante western-blot.

Tanto el anticuerpo primario anti-DNPH como la solución de derivatización que se utilizaron son componentes de un kit (Oxiselect™ Protein Carbonyl Immunoblot Kit, Cell Biolabs, San Diego, CA, EEUU). El resto de reactivos son los mismos que los utilizados para un inmunoblot (ver apartado 3.3.6).

Se preparó el volumen de homogenado necesario para cargar 10µg de proteína con el tampón de carga y se realizó una electroforesis SDS-PAGE con un gel al 12% sin dejar salir el frente. El gel completo se electrotransfirió a una membrana de nitrocelulosa sobre la que se llevó a cabo el proceso de derivatización, compuesto por las siguientes etapas:

- Equilibrado de la membrana con TBS al 20% de MetOH, 5 minutos
- Lavado con HCl 2N, 5 minutos
- Derivatización con la solución de derivatización 1x en HCl 2N
- Lavado con HCl 2N, 5 minutos (5x)
- Lavado con MetOH 50%, 5 minutos (5x)

Posteriormente se procedió a realizar el inmunoblot, todo el proceso a temperatura ambiente. Para ello la membrana se bloqueó con leche desgrasada en polvo al 5% en TBS-T durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación y tras tres lavados de 5 minutos con TBS-T se procedió a la incubación con el anticuerpo primario 1:4000, 90 minutos. De nuevo se realizaron los lavados y se incubó esta vez 1 hora con el anticuerpo secundario, anti-*rabbit* 1:2000. Finalmente se realizaron dos lavados más de 5 minutos con TBS-T y uno último con TBS y se procedió al revelado y la captación.

Daño oxidativo en lípidos

La peroxidación lipídica es un proceso complejo que implica la interacción de los ROS con ácidos grasos poliinsaturados, produciendo una variedad de aldehídos electrófilos muy reactivos, como el 4-hidroxi-2-nonenal (HNE), que

pueden unirse a otras biomoléculas provocando cambios estructurales y funcionales (Esterbauer, et al. 1991). La medida de estos productos de la peroxidación se considera una medida indirecta de la misma.

Para su detección se usó un procedimiento inmunoquímico basado en el western-blot. Para ello se prepararon 40µg de proteína de cada muestra con tampón de carga y se realizó una electroforesis SDS-PAGE con un gel al 12% sin dejar salir el frente (ver apartado 3.3.6). Posteriormente se transfirió el gel completo a una membrana de nitrocelulosa que se bloqueó con 5% de leche desgrasada en polvo en TBS-T, 1 hora, temperatura ambiente y agitación. Se hicieron 3 lavados de 5 minutos con TBS-T en agitación y se incubó con *Rabbit* anti-HNE 1:200 o/n a 4°C en agitación constante. De nuevo se realizaron los lavados con TBS-T y se incubó 1 hora con anti-*rabbit* IgG diluido 1:10000 en 5% de leche desgrasada en polvo en TBS-T. Por último se realizaron dos lavados de 5 minutos en TBS-T y un último lavado de 5 minutos con TBS antes del revelado.

3.3.8. Medida de la expresión génica

Retrotranscripción

El ARN total se preparó para obtener 1µg en 5µL en el caso del músculo y de las células. Este volumen se completó con 5µL de mezcla de retrotranscripción. En el caso del TAB, en el que el rendimiento de la extracción de ARN es menor, se preparó 1µg en 10µL de agua libre de ARNasas, y se completó con 10µL de mezcla de retrotranscripción. A partir de entonces se procedió del mismo modo con todas las muestras.

El ARN se retrotranscribió a ADN complementario (ADNc) manteniéndolo a 42°C durante 60 minutos con 15U de transcriptasa reversa MuLV en la mezcla de retrotranscripción, compuesta por: Tris-HCl 10mM (pH 9), KCl 50mM, Triton® X-100 0.1%, MgCl₂ 2.5mM, hexámeros aleatorios 2.5µM,

10U de inhibidor de las ARNasas y 500 μ M de cada uno de los dNTPs en un termociclador GeneAmp 9700 (Applied Biosystems, Lincoln, CA, EEUU). Los ADNc obtenidos se diluyeron 1/10 con agua libre de ARNasas.

PCR a tiempo real

A partir de este ADNc se realizó la PCR a tiempo real utilizando la tecnología LightCycler® 480 SYBR Green I Master en un termociclador rápido LightCycler® 480 System II (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). Cada reacción requiere de 5 μ l de LightCycler® 480 SYBR Green I Master (compuesta por FastStart Taq DNA polymerase, mezcla de dNTP, tampón de reacción, MgCl² y marcador SYBR Green I) y 0.5 μ M de cada uno de los cebadores específicos (directo e inverso) en un volumen final de 7.5 μ L obtenido con agua libre de ARNasas. Esta mezcla se completa con 2.5 μ l de la dilución de ADNc. El programa de amplificación consiste en un paso preliminar de desnaturalización del ADNc (94°C, 2 minutos) seguido de 40-45 ciclos consistentes en un paso de desnaturalización (95°C, 10 segundos), alineamiento (temperatura dependiente del cebador, 10 segundos), extensión (72°C, 12 segundos) y un paso de captación de la fluorescencia. Los resultados se analizaron mediante el programa Genex Standard Software (MultiDAnalises, Suecia). En el caso particular del análisis del ADNmt, la PCR se realizó a partir de 5ng de ADN genómico siguiendo el mismo protocolo. Las condiciones específicas para cada uno de los genes analizados están representadas en las Tablas 5 y 6. Una vez terminada la PCR se recogieron todos los amplificados y se almacenaron a 4°C para determinaciones posteriores.

Cálculo de la eficiencia

La eficiencia de una pareja de cebadores es inherente a los propios cebadores y al tipo de muestra sobre el que estén actuando. Por ello, para cada pareja y tipo de muestra, se realizó un análisis de la eficiencia que se aplicó en los

cálculos posteriores. De la mezcla de amplificados obtenida se realizó un banco de diluciones y de cada punto se hizo la PCR. A partir de la aplicación del programa para cálculo de patrones incorporado en el software de Roche Diagnostics se obtuvo la eficiencia de la reacción.

Confirmación de la especificidad. Electroforesis en gel de agarosa

Para corroborar la especificidad de la reacción, además de evaluar la temperatura de fusión se realizó una electroforesis en gel de agarosa. Se prepararon 5 μ L del amplificado con tampón de carga de bromuro de etidio y se corrió la electroforesis durante 45 minutos a 80V constantes en un gel de agarosa al 1.5% (30mL) con 2 μ L de bromuro de etidio al 1%. Se utilizó un marcador de 100pb para determinar el tamaño de cada amplicón. Posteriormente se visualizó el resultado con el captador Chemidoc XRS (BioRad, CA, EEUU) y de su software de análisis asociado Quantity One (BioRad, CA, EEUU)

Tabla 5.- Secuencias de los cebadores de rata utilizados y detalles de las condiciones de amplificación.

Gen	Cebador directo (5'-3') Cebador inverso (5'-3')	T unión (°C)	Longitud (pb)	T fusión (°C)
18S	cgaacctccgactttcgttct gcggtgaaattctggaccgg	61(ADNc) 63 (ADNg)	90	79
Actina	gagacctcaacacccc gtggtggtgaagctgtagcc	56	235	86
Adiponectina	gaaggagagaaggagacg cgctgaatgctgagtataca	56	157	86
AdipoR1	gtcgacaggcctaagtgtcc ctagaaggagccccattgcc	60	165	85
ADNmt	tacacgatgagcaacaaa ggtagggggtgtgttgag	59	142	77
Cpt1m	ttgagatgcacggcaagac ctggacaagaggcgaacaca	59	64	82
Fis1	tgtagcgtgaaggattgcag cttcattctgggcatccat	60	203	84
Mfn1	gacgacagcacatggaaaga cttgctgaaatccttctgc	60	177	80
Mfn2	aggaaattgctccatgaac gtctcttctcggcaggtc	60	174	84
Nrf1	cctctgatgcttgcgtctct ttactctgctgtggctgatgg	55	87	81
Pgc1a	atctactgcctggggacctt atgtgtcgccttcttctct	60	179	81
Pgc1b	actatgatcccacgtctgaagatc ccttctgaggtattgaggtatc	61	123	81
Resistina	ctagctgctcctgtggctct aggcaagctcagttctcaa	61	154	87
Sirt1	cagtgtcatggttcctttgc caccgaggaactactgat	56	103	77
Sirt3	aggccatatecctctctgt actcctgggatctgaagt	55	185	86
Tfam	gctaaacaccagatgcaaaa cgaggctttttggtttcc	63	268	81

ADNc, ADN complementario; ADNg, ADN genómico; AdipoR1, receptor de adiponectina 1; Cpt1m, carnitin-palmitoil transferasa 1m; Fis1, fisión1; Mfn 1 y 2, mitofusinas 1 y 2; ADNmt, ADN mitocondrial; Nrf1, factor de respiración nuclear 1; Pgc1 a y b, coactivador 1 alfa y beta del receptor activado por proliferadores peroxisomales1 gamma; Sirt1 y 3, sirtuinas 1 y 3; Tfam, factor de transcripción mitocondrial A

Tabla 6.- Secuencias de los cebadores de ratón utilizados y detalles de las condiciones de amplificación.

Gen	Cebador directo (5'-3') Cebador inverso (5'-3')	T unión (°C)	Longitud (pb)	T fusión (°C)
18S	cctccaatggatcctcgt aaacggctaccacatcca	54	160	83
Adiponectina	gttgcaagctctcctgttcc tctccaggagtgccatctct	55	192	85
AdipoR1	agatggaggagttcgtgtataag atgtagcaggtagtcgtgtc	54	100	81
AdipoR2	ccacaacctgttcatctacc acgaacactcctgctctgac	54	118	82
ADNmt	aagacgccacatcccctatt cttcagtatcattgggtgccct	53	291	84
ALBP/aP2	ccgatccactccttacctca gccaccgtgacctgtactt	56	234	84
Citrato sintasa	gtagctggagacgcttt agaggcctggaaggaaac	53	157	77
Cox4	agaaggcgtgaaggagaaggaa ccagcatgccgaggagtgga	58	385	86
Drp1	agaaaactgtctgcccgaga gctgccctaccagttcactc	53	169	77
Fis1	aagtatgtgagggctgtt acagccagtccaatgagtc	53	166	86
GABPa	ggggaacagaacaggaaaca ccgtaatgcacggctaagtt	60	189	84
Mfn1	gctgtcagagcccatcttc cagccactgtttccaat	51	198	85
Mfn2	ggagaccaacaaggactgga aagtaggagtgctgctgca	55	176	84
Nrf1	cctctgatgcttgcgtcgtct ttactctgctgtggctgatgg	55	71	81
Opa1	gatgacacgctctccagtga tcggggtaacagtacaacc	55	176	80
Pgc1a	atctactgcctggggacctt atgtgtcgccttcttgcct	62	179	81
Pgc1b	actatgatcccacgtctgaagatc ccttgctgaggattgaggtattc	61	123	81
Pparg	ttttcaagggtgccagtttc aatccttggccctctgagat	56	173	80
Resistina	ccaaggtccagtctcctccg agggtgtgtgtgggaattgt	56	169	80
Tfam	agccagggtccagctcact aaaccaagaagcatgt	52	165	77

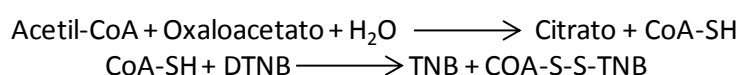
AdipoR1 y 2, receptor de adiponectina 1 y 2; ADNmt, ADN mitocondrial; ALBP/aP2, proteína de unión a lípidos de los adipocitos aP2; Cox4, citocromo c oxidasa subunidad 4; Drp1, proteína relacionada con la dinamina1; Fis1, fisión1; GABPa, proteína de unión a GA alfa; Mfn 1 y 2, mitofusinas 1 y 2; ADNmt, ADN mitocondrial; Nrf1, factor de respiración nuclear 1; Opa1, proteína de atrofia óptica 1; Pgc1 a y b, coactivadores 1 alfa y beta del Pparg; Pparg, receptor activado por proliferadores peroxisomales1 gamma; Tfam, factor de transcripción mitocondrial A

3.3.9. Actividades enzimáticas

La determinación de las actividades enzimáticas se llevó a cabo en los homogenados tisulares o bien en el lisado celular obtenido a tal efecto.

3.3.9.1. Citrato sintasa

La citrato sintasa es un enzima mitocondrial que cataliza la primera reacción del ciclo de Krebs. Su actividad se determinó espectrofotométricamente según el método adaptado por Nakano *et al.* (Nakano, et al. 2005), basado en el registro del incremento de D.O. a 412nm producido como resultado de la reducción del ácido dinitrobenzoico (DTNB) según las siguientes reacciones:



Reactivos y procedimiento

Se cargaron en el orden indicado los siguientes reactivos en cada pocillo:

Tris 0.16M pH 8	125µl
DTNB 10mM en Tris 0.1M pH 8.3	2µl
Muestra convenientemente diluida en tampón ^(*)	25µl
Tritón X-100 0.8% en H ₂ O	25µl
Acetil-CoA 0.25mM en H ₂ O	25µl

^(*) La dilución apropiada de homogenado para la determinación en gastrocnemius blanco fue 1/5, y en el caso del lisado de 3T3-L1 se utilizó una dilución 1/10. Para el TAB gonadal hubo que usar mayor volumen de muestra, por lo que se utilizaron 25-35µL de homogenado que se compensaron con la consiguiente disminución del volumen de Tris 0.16M pH 8.

Se incubó a 30°C durante 3 minutos y se añadió en todos los pocillos de forma rápida 25µL de oxaloacetato 2.5mM en H₂O. Se midió el aumento de absorbancia a 412nm durante 25 minutos.

Cálculos

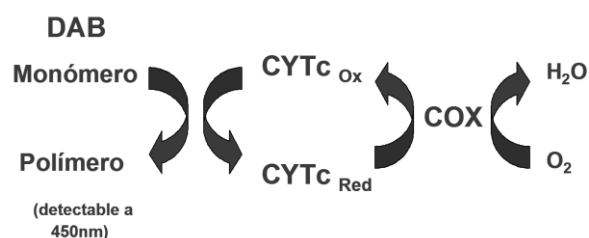
Los cálculos se realizaron aplicando la ley de Beer-Lambert, siendo el coeficiente de extinción molar del DTNB reducido 13.6mM⁻¹cm⁻¹. Para la longitud del paso óptico se tuvo en cuenta el volumen introducido en la celda (Tabla 7).

Tabla 7.- Tabla de variación de la longitud del paso óptico de una placa de 96 pocillos en función del volumen de muestra.

Volumen (µL)	L (cm)
125	0.435736677
150	0.507053292
175	0.572884013
200	0.64184953
225	0.713949843
250	0.780956113
275	0.855015674
300	0.930250784
325	0.970219436

3.3.9.2. Citocromo c oxidasa

La citocromo c oxidasa (COX) es el complejo terminal de la cadena respiratoria i cataliza la reducción de oxígeno molecular hasta agua por 4 electrones que, de manera natural, provienen del citocromo c. El gran interés de esta reacción radica en que es la única reacción irreversible de la cadena respiratoria. Su detección se basa en el método de Chrzanowska-Lightowlers *et al.* (Chrzanowska-Lightowlers, et al. 1993), que se fundamenta en que la COX oxida el citocromo c, y este vuelve a ser reducido por el DAB el cual va formando un polímero detectable a 450nm cuya aparición es directamente proporcional a la actividad de la COX.



Reactivos y procedimiento

Preparación del citocromo C reducido 807 μM : Se preparó una solución de citocromo (50mg de citocromo c, 500 μl de ácido ascórbico al 10% y 4.5mL de tampón NaPO_4H_2 0.001M pH7) y se introdujo en una bolsa de diálisis hervida. Se colocó la bolsa en un matraz kitasato lleno de tampón NaPO_4H_2 0.01M sin que contactase con las paredes y se dejó o/n en agitación suave a 4°C protegido de la luz. El tampón se cambió 3 veces durante las 24 horas siguientes para eliminar el exceso de ácido ascórbico.

Se cargaron en los pocillos los siguientes reactivos en el orden indicado:

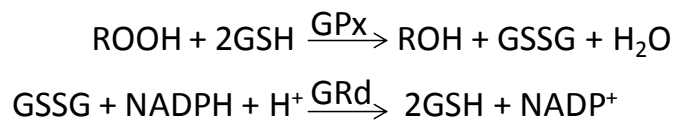
Tampón NaPO_4H_2 0.1M, pH 7	140 - X μl
Catalasa en tampón NaPO_4H_2 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$...	10 μl
Muestra (*).....	X μl
DAB 50mM en H_2O_2 (preparado al instante)...	20 μl
Citocromo C reducido 807 μM	30 μl
	Volumen final: 200 μl

(*) Para la determinación en gastrocnemius blanco se precisaron 10-15 μL de homogenado, y en el caso del TAB gonadal fueron necesarios 90 μL .

Se agitó vigorosamente la placa y se leyó a 450nm durante 30 minutos. Los cálculos se representaron en unidades arbitrarias, ya que no se puede aplicar la ley de Beer-Lambert porque se desconoce el coeficiente de extinción molar del DAB.

3.3.9.3. Glutación peroxidasa

La glutatión peroxidasa (GPx) cataliza la reducción de peróxido de hidrógeno y peróxidos orgánicos utilizando como agente reductor el glutatión (GSH). El glutatión oxidado que se genera en esta reacción (GSSG) es reducido de nuevo a GSH mediante el enzima glutatión reductasa (GRd), reacción en la cual se oxida NADPH y se forma NADP⁺. En presencia de peróxido, GSH, GRd y NADPH, la actividad de la GPx puede cuantificarse siguiendo la oxidación del NADPH a través de la disminución de la absorbancia a 340nm (Smith, et al. 2001).



Reactivos

- Tampón de reacción (pH7.6): Tris-HCl 50mM, EDTA 5mM
- Glutatión reducido 35mM en H₂O
- NADPH 7.7mM en H₂O
- Glutation reductasa 14U/mL en tampón de reacción
- Tert-butil-hidroperóxido (TBH) 3mM en tampón de reacción

Procedimiento

Se introdujeron los reactivos en el pocillo en el orden indicado:

Tampón de reacción	245 – X µl
GSH 35mM	10µl
NADPH 7.7mM	10µl
GRd 14U/mL	10µl
Muestra (*)	X µl

(*) Cuando se trabajó con gastrocnemius blanco se precisaron 50µL de homogenado

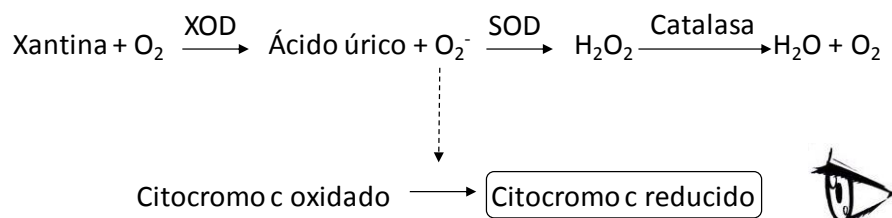
Se preincubó a 37°C durante 5 minutos y se inició la reacción añadiendo 25µL de TBH. Se registró la disminución de la absorbancia a 340nm durante 10 minutos.

Cálculos

Los cálculos se realizaron aplicando la ley de Beer-Lambert, siendo el coeficiente de extinción molar del NADPH $6.22\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Para la longitud del paso óptico ver tabla 7.

3.3.9.4. Superóxido dismutasa

La superóxido dismutasa es la principal defensa antioxidante enzimática contra los ROS, concretamente contra el anión superóxido que se forma a nivel de la cadena respiratoria mitocondrial, ya que cataliza la dismutación de dos moléculas de superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular ($\text{O}_2^- + \text{O}_2^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$). El método utilizado es una variación del descrito por Quick (Quick, et al. 2000), basado en la capacidad del superóxido para reducir el citocromo c. En presencia de SOD la reducción de citocromo c (medible espectrofotométricamente) será menor ya que el enzima actuará contra el superóxido. El conjunto de reacciones acopladas que se da es el siguiente:



Reactivos

- _ PBS pH 7.4
- _ Xantina 10mM en NaOH 30mM

- _ Citcromo c 1.95mM en PBS pH 7.4
- _ Superóxido dismutasa 10200U/mL en PBS pH 7.4
- _ Catalasa 6000U/mL en PBS pH 7.4
- _ Xantina oxidasa 335mU/mL en PBS pH 7.4. Preparar al momento

Procedimiento

Se prepararon en el momento de la determinación la solución A (a partir de las soluciones madre) para tantas muestras como era necesario. Para una sola muestra los volúmenes son los siguientes: PBS 114.1 μ L, catalasa 2.5 μ L, xantina 2.5 μ L, citocromo c 5.9 μ L. El volumen final por muestra es de 125 μ L.

Se cargaron en la placa un blanco, un control 1 (C1), un control 2 (C2) y las muestras según el siguiente esquema y en el orden indicado:

	Blanco	C1	C2	Muestra
Tampón de la muestra	250 μ L	\	\	\
PBS	\	116 μ L	102 μ L	116 - X μ L
Muestra (*)	\	\	\	X μ L
XOD	\	9 μ L	9 μ L	9 μ L
SOD	\	\	14 μ L	\
Solución A	\	125 μ L	125 μ L	125 μ L

(*) Para la determinación en gastrocnemius blanco se utilizaron 5-10 μ L de homogenado

Se agitó la placa durante 10 segundos y se leyó la absorbancia a 550nm durante 6 minutos.

Cálculos

La pendiente del C2 no se utilizó en los cálculos, ya que la función de esta muestra es actuar como control de calidad. Al tener mucha SOD, habrá poco superóxido disponible para reducir el citocromo c y por tanto su pendiente debe ser baja. En el C1, al no haber SOD, se observa la máxima reducción del citocromo c por el superóxido y por tanto su pendiente debe ser la mayor. El primer paso al hacer los cálculos es restar esta pendiente de la pendiente neta

de las muestras. La diferencia es el indicador de la actuación de la SOD de nuestra muestra.

Los cálculos posteriores se realizaron aplicando la ley de Beer-Lambert, siendo el coeficiente de extinción molar del citocromo c reducido $21\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Para la longitud del paso óptico ver tabla 7.

3.3.10. Estudio de microscopía mediante análisis confocal

El microscopio confocal es un microscopio óptico de fluorescencia que ofrece importantes ventajas respecto al microscopio de fluorescencia tradicional: imágenes de mayor nitidez y contraste, mayor resolución y, sobretodo, la posibilidad de obtener secciones ópticas de la muestra, lo que permite su análisis tridimensional. El fundamento de la técnica se basa en eliminar la luz reflejada o fluorescente procedente de los planos fuera de foco.

La red mitocondrial se observó mediante esta tecnología a través de la tinción con Mitotracker Green (Molecular Probes, Eugene, OR, EEUU), una tinción fluorescente que se acumula selectivamente en la matriz mitocondrial, donde se une covalentemente a proteínas mitocondriales reaccionando con los grupos tiol libres de residuos de cisteína.

Para su análisis, las células se diferenciaron en portaobjetos con cámaras (Labtek II, Nunc) o bien en cubreobjetos introducidos en las placas de cultivo, y se les realizó el tratamiento oportuno. En el momento del análisis se marcaron las mitocondrias con una solución de Mitotracker Green 100nM durante 1 hora (muestra protegida de la luz, 37°C , $5\%\text{CO}_2$), tras la que se hicieron dos lavados con medio fresco. Las muestras se analizaron inmediatamente para evitar la difusión del marcador. Se obtuvieron imágenes 40x y 63x con un microscopio Leica a través del programa asociado, Leica Application Suite versión Advance Fluorescence 2.3.6, y se analizaron mediante el programa de libre acceso ImageJ.

3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS 21.0 para Windows (Chicago, IL, EEUU).

3.4.1. Análisis estadístico del experimento OVARIECTOMÍA

Los datos se expresaron como la media de cada grupo \pm el error tipo de 6 animales por grupo. Para establecer las diferencias entre grupos se aplicó un análisis de varianza con un factor (ANOVA). Las diferencias se consideraron significativas cuando la p era inferior a 0.05, en cuyo caso se aplicó un análisis LSD para determinar las diferencias entre grupos.

3.4.2. Análisis estadístico del experimento ROSIGLITAZONA

Los datos se expresaron como la media de cada grupo \pm el error tipo de 8 animales por grupo. Para establecer las diferencias entre los grupos se aplicó una ANOVA de dos factores para sexo y dieta (ANOVA1) y otra ANOVA para sexo y Rsg (ANOVA2), seguidas ambas de un post-hoc T-test.

3.4.3. Análisis estadístico en los estudios *in vitro*

Los datos se expresaron como la media de cada grupo \pm el error tipo de 6 muestras por tratamiento obtenidas a partir de 3 experimentos independientes realizados por duplicado. Para establecer las diferencias entre grupos se aplicó un análisis T-test. Las diferencias se consideraron significativas cuando la p era inferior a 0.05. En los casos en que se comparaban más de dos grupos se utilizó una ANOVA de un factor seguida por un análisis T-test para establecer las diferencias entre grupos. Para aplicar la estadística se utilizó el programa estadístico SPSS 21.0 para Windows (Chicago, IL, EEUU).



Resultados y discusión

4.1. EFECTO DE LAS HORMONAS SEXUALES SOBRE LA BIOGÉNESIS MITOCONDRIAL Y LA SÍNTESIS DE ADIPONECTINA EN ADIPOCITOS BLANCOS

Los resultados presentados y discutidos en este apartado provienen de los datos obtenidos a partir de los cultivos de adipocitos blancos 3T3-L1 tratados con hormonas sexuales, y se centran en el objetivo de dilucidar si las hormonas sexuales, específicamente el E2, modulan la expresión de los marcadores de biogénesis y dinámica mitocondriales y de la síntesis de adiponectina en los adipocitos, lo que supondría una evidencia del nexo existente entre estos procesos en el TAB y del papel que las hormonas sexuales jugarían en dicho nexo.

4.1.1. Resultados

Efecto de los tratamientos hormonales sobre los marcadores de función y biogénesis mitocondriales

El tratamiento con E2 incrementó la expresión de *Pgc1a*, *Pgc1b* y *Tfam*, que son reguladores clave del contenido y la funcionalidad mitocondrial (Tabla 8). Los niveles de ARNm de *Cox4*, el ADNmt, el contenido de cardiolipina (un indicador de la cantidad de membrana interna mitocondrial) y la masa mitocondrial medida por la intensidad de la fluorescencia de MTG (Figura 8) aumentaron también en respuesta al tratamiento con E2. El tratamiento con Pg aumentó los niveles de ADNmt, la intensidad del MTG y el contenido de cardiolipina, mientras que los niveles de ARNm de *Cox4*, *Pgc1b*, *Nrf1* y *GABPa* disminuyeron. Por su parte, el tratamiento con T redujo la expresión de *Cox4*, *Pgc1b* y *GABPa* así como la actividad citrato sintasa (CS) y la masa mitocondrial medida mediante la fluorescencia del MTG (Figura 8).

Efecto de los tratamientos hormonales sobre los marcadores de dinámica mitocondrial

La expresión de genes codificantes para proteínas relacionadas con los procesos de fusión y de fisión en la mitocondria se muestra en las Figuras 9A, 10aA y 11aA. El tratamiento con E2 indujo un aumento en los niveles de ARNm de *Opa1* y *Drp1*. La Pg incrementó la expresión de *Mfn1* pero disminuyó los niveles de ARNm de *Fis1* y de *Drp1*. La adición de E2 a células tratadas con Pg revirtió los valores de ARNm de *Fis1* y de *Drp1* a los niveles de las células control. La adición de FLT tuvo el mismo efecto sobre los niveles de *Drp1* y aumentó también los niveles de *Fis1*, aunque sin alcanzar este último los valores de los controles. El tratamiento con T indujo un aumento en los niveles de ARNm de *Mfn1* que fue revertido a los niveles control con la suplementación tanto de FLT como de E2. La expresión de *Fis1* y de *Drp1* también disminuyó por efecto de la T. La FLT y el E2 restituyeron los niveles de ARNm de *Drp1* de las células tratadas con T a los niveles control, y lo mismo sucedió con el ARNm de *Fis1* al adicionar FLT. Por otra parte, los niveles de *Fis1* aumentaron por encima de los valores control en el tratamiento con T+E2.

Efecto de los tratamientos hormonales sobre los niveles de adipoquinas y de sus receptores

Los efectos del E2, las Pg y la T sobre la expresión de adipoquinas y de sus receptores se muestran en las Figuras 9, 10b y 11b respectivamente. El E2 provocó un aumento en el contenido de adiponectina de los adipocitos 3T3-L1 que se reflejó en los niveles de adiponectina secretada al medio de cultivo. Los niveles de ARNm de adiponectina, resistina y receptores de adiponectina no se vieron afectados por el tratamiento con E2. Las células tratadas con Pg mostraron un menor contenido de ARNm y de proteína adiponectina, así como una menor expresión de los receptores de adiponectina, en comparación con las células control. La combinación del tratamiento de Pg con E2 indujo un mayor descenso de la expresión de adiponectina que la Pg

sola. Únicamente los niveles de ARNm de *AdipoR1* recuperaron los valores control cuando se adicionó FLT al tratamiento de Pg. El tratamiento de Pg+E2 restauró la expresión de *AdipoR2* a los niveles control y aumentó la expresión de *AdipoR1* por encima de esos niveles. Los niveles de ARNm de resistina aumentaron con el tratamiento de Pg, pero ni la combinación con FLT ni con E2 los devolvió a los valores control. El tratamiento con T indujo un descenso en los niveles tanto de proteína como de ARNm de adiponectina y también en la expresión de sus receptores. Tanto la FLT como el E2 evitaron este descenso asociado a la T, y en el caso específico de *AdipoR1*, la adición de dichos compuestos provocó un incremento que superó los valores control. Los niveles de ARNm de resistina aumentaron con el tratamiento de T y descendieron con la adición tanto de FLT como de E2.

Efecto de los tratamientos hormonales sobre los niveles de ARN de marcadores adipogénicos y sobre la relación de los niveles de proteína de los receptores de estrógenos.

La expresión del marcador adipogénico *ALBP/aP2* se incrementó en las células tratadas con E2 (Figura 9A), mientras que la expresión de *Pparg* no se vio afectada por el tratamiento con E2 (Figura 9A) ni con T (Figura 11aB) pero disminuyó con la Pg (Figura 10aB). La incorporación de E2 indujo un aumento de *Pparg* que resultó en niveles mayores que los de las células control. La relación de los niveles de proteína de los receptores de estrógenos (ERa/ERb) no se vio afectada por los tratamientos con E2 ni con Pg mientras que disminuyó en respuesta al tratamiento con T (Figura 12).

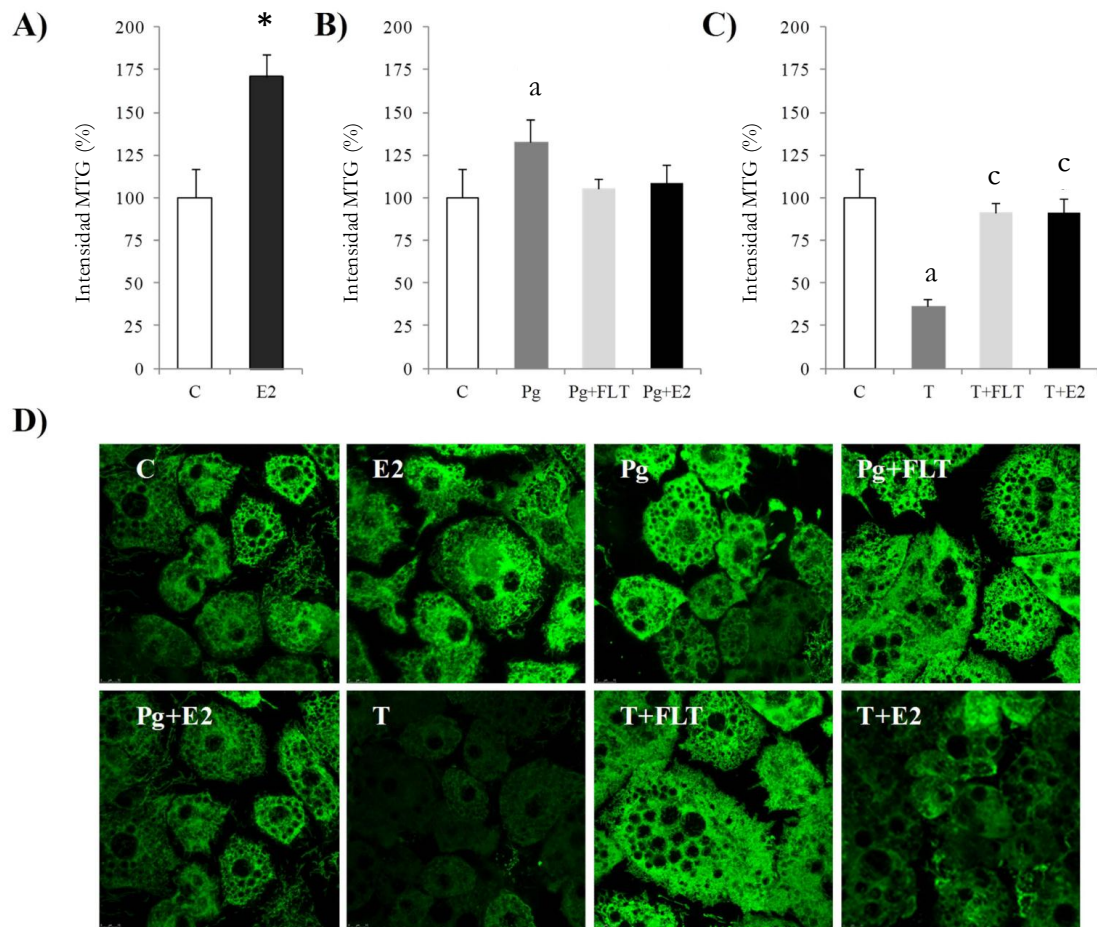


Figura 8.- Efecto de los tratamientos hormonales sobre la masa mitocondrial de los adipocitos blancos 3T3-L1. A)B)C) Intensidad de la fluorescencia MTG D) Imágenes representativas de microscopía confocal. E2, 17beta-estradiol; Pg, progesterona; T, testosterona; FLT, flutamida; MTG, Mitotracker Green. Los valores están expresados como la media \pm SEM de 9 regiones de un campo de visión. Los valores de las células control se establecieron como 100. Para cuantificar la intensidad del MTG se utilizó el software ImageJ. La figura A muestra los efectos del tratamiento con E2. T-test ($p < 0.05$): *, indica diferencia vs las células control. Las figuras B y C muestran los efectos de los tratamientos de Pg y de T solos o bien combinados con FLT o E2. ANOVA de un factor ($p < 0.05$) y análisis post hoc (LSD, $p < 0.05$): a, diferencia significativa vs las células control; b, diferencia significativa vs las células tratadas con Pg; c, diferencia significativa vs las células tratadas con T.

Tabla 8.- Efecto de las hormonas sexuales sobre los marcadores de biogénesis y función mitocondriales en los adipocitos blancos 3T3-L1

	Control	E2	Pg	T
<i>Pgc1a</i> ARNm (UA)	1.48 ± 0.17	2.04 ± 0.19*	1.12 ± 0.06	1.96 ± 0.25
<i>Pgc1b</i> ARNm (UA)	2.42 ± 0.07	3.73 ± 0.43*	1.75 ± 0.24*	2.21 ± 0.06*
<i>Nrf1</i> ARNm (UA)	3.28 ± 0.18	3.33 ± 0.38	1.73 ± 0.30*	3.52 ± 0.50
<i>GABP a</i> ARNm (UA)	2.80 ± 0.09	2.97 ± 0.32	1.34 ± 0.11*	1.53 ± 0.06*
<i>Tfam</i> ARNm (UA)	1.55 ± 0.20	2.80 ± 0.39*	1.35 ± 0.11	1.91 ± 0.28
ADNmt (UA)	5.91 ± 2.37	49.9 ± 17.7*	22.3 ± 0.9*	3.89 ± 1.09
Cardiolipina (%)	100 ± 2	112 ± 5*	115 ± 3*	104 ± 4
<i>Cox4</i> ARNm (UA)	2.92 ± 0.25	3.44 ± 0.08*	1.73 ± 0.32*	2.19 ± 0.30*
<i>Ct</i> ARNm (UA)	2.41 ± 0.54	3.17 ± 0.36	2.16 ± 0.23	2.58 ± 0.16
Actividad CS (UI/mgADN)	4.75 ± 0.14	5.08 ± 0.27	4.64 ± 0.41	4.21 ± 0.09*

E2, 17beta-estradiol; Pg, progesterona; T, testosterona; *Pgc1 a* y *b*, coactivadores 1 alfa y beta del receptor activado por proliferadores peroxisomales1 gamma; *Nrf1*, factor de respiración nuclear 1; *GABPa*, proteína de unión a *Gα* alfa *Tfam*, factor de transcripción mitocondrial A; *ADNmt*, ADN mitocondrial; *Cox4*, citocromo c oxidasa subunidad 4; *CS*, citrato sintasa. Los resultados están expresados en unidades arbitrarias (UA) o en unidades internacionales (UI). Los valores están expresados como la media ± SEM de tres experimentos independientes realizados por duplicado (n=6). Los valores de las células control se establecieron como 100 en la determinación del contenido de cardiolipina. Para la normalización de los valores de *Ct* al 18S se utilizó el software GenEx. T-test (p<0.05): *, diferencia significativa vs a las células control.

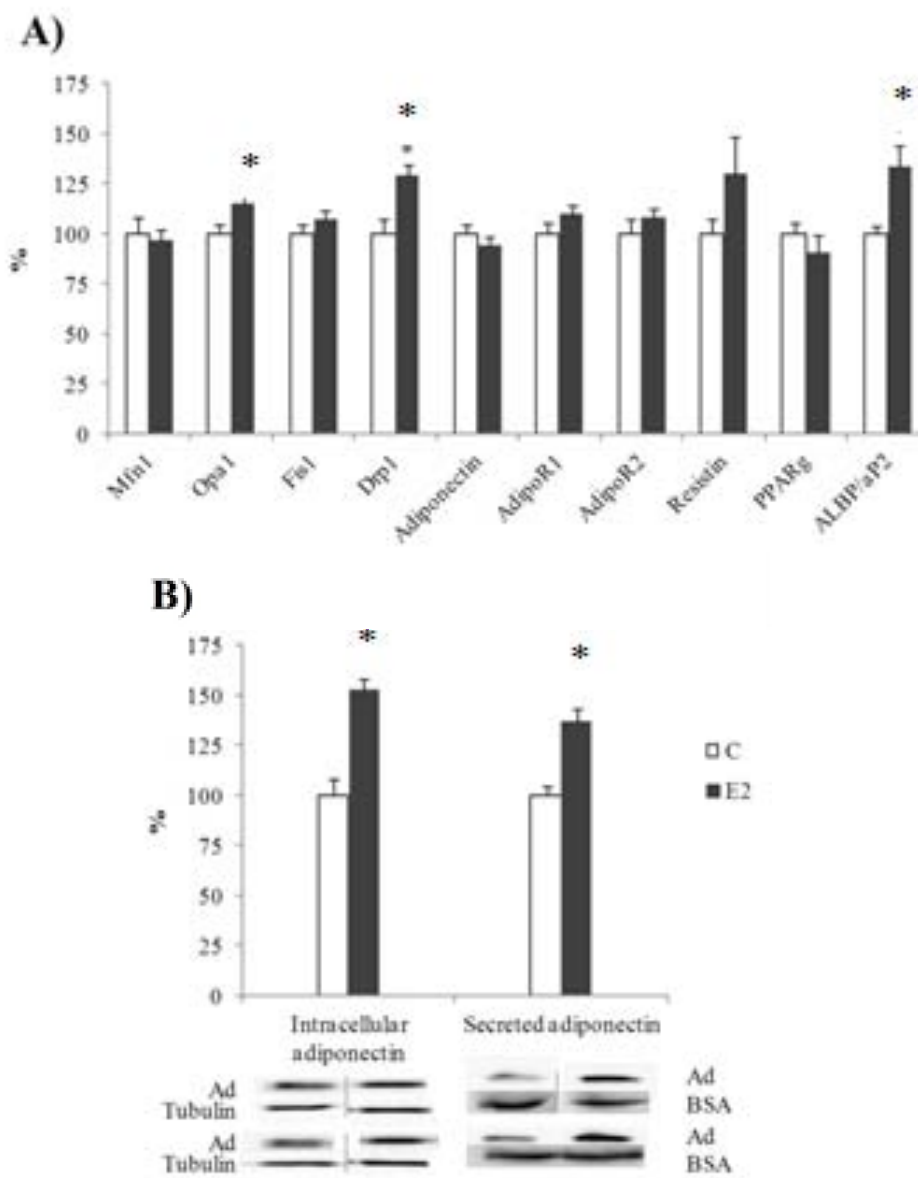


Figura 9.- Efecto del E2 sobre los niveles de expresión de marcadores de dinámica mitocondrial y adipogénicos, adipoquinas y receptores de adiponectina en los adipocitos blancos 3T3-L1. E2, 17beta-estradiol; Mfn1, mitofusina 1; Opa1, protein de atrofia óptica 1; Fis1, proteína de fisión 1; Drp1, proteína relacionada con la dinamina 1; AdipoR1 y AdipoR2, receptores de adiponectina 1 y 2; Pparg, receptor activado por proliferadores de peroxisomas gamma; ALBP/aP2, proteína adipocítica de unión a lípidos aP2; Ad, adiponectina; BSA, albúmina de suero bovino. Los valores están expresados como la media \pm SEM de 3 experimentos independientes realizados por duplicado (n=6). Los valores de las células control se establecieron como 100. Para analizar los valores de Ct normalizados respecto al 18S se utilizó el software Genex. Dos immunoblots representativos se muestran bajo los gráficos correspondientes, y cuando las bandas del immunoblot han sido agrupadas de diferentes partes del mismo gel se ha indicado con líneas en la figura. T-test ($p < 0.05$): *, indica diferencia vs las células control.

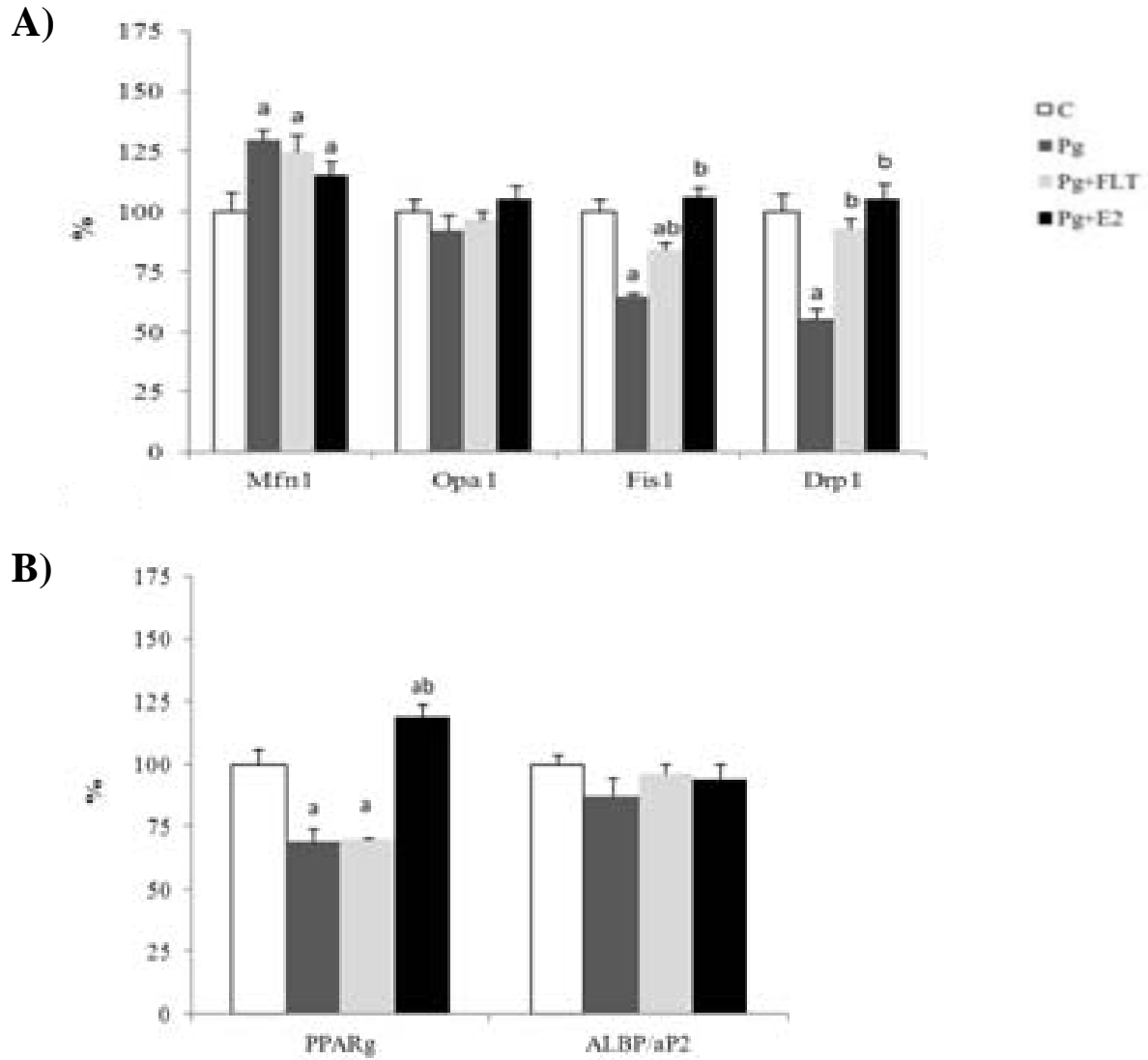


Figura 10a.- Efecto de la progesterona y sus tratamientos combinados con flutamida o con E2 sobre los niveles de expresión de marcadores de dinámica mitocondrial (A) y adipogénicos (B) en los adipocitos 3T3-L1. Pg, progesterona; E2, 17beta-estradiol; Mfn1, mitofusina 1; Opa1, proteína de atrofia óptica 1; Fis1, proteína de fisión 1; Drp1, proteína relacionada con la dinamina 1; Pparg, receptor activado por proliferadores de peroxisomas gamma; ALBP/aP2, proteína adipocítica de unión a lípidos aP2. Los valores están expresados como la media \pm SEM de 3 experimentos independientes realizados por duplicado (n=6). Los valores de las células control se establecieron como 100. Para analizar los valores de Ct normalizados respecto al 18S se utilizó el software Genex. ANOVA de un factor ($p < 0.05$) y análisis post hoc (LSD, $p < 0.05$): a, diferencia significativa vs las células control; b, diferencia significativa vs las células tratadas con Pg.

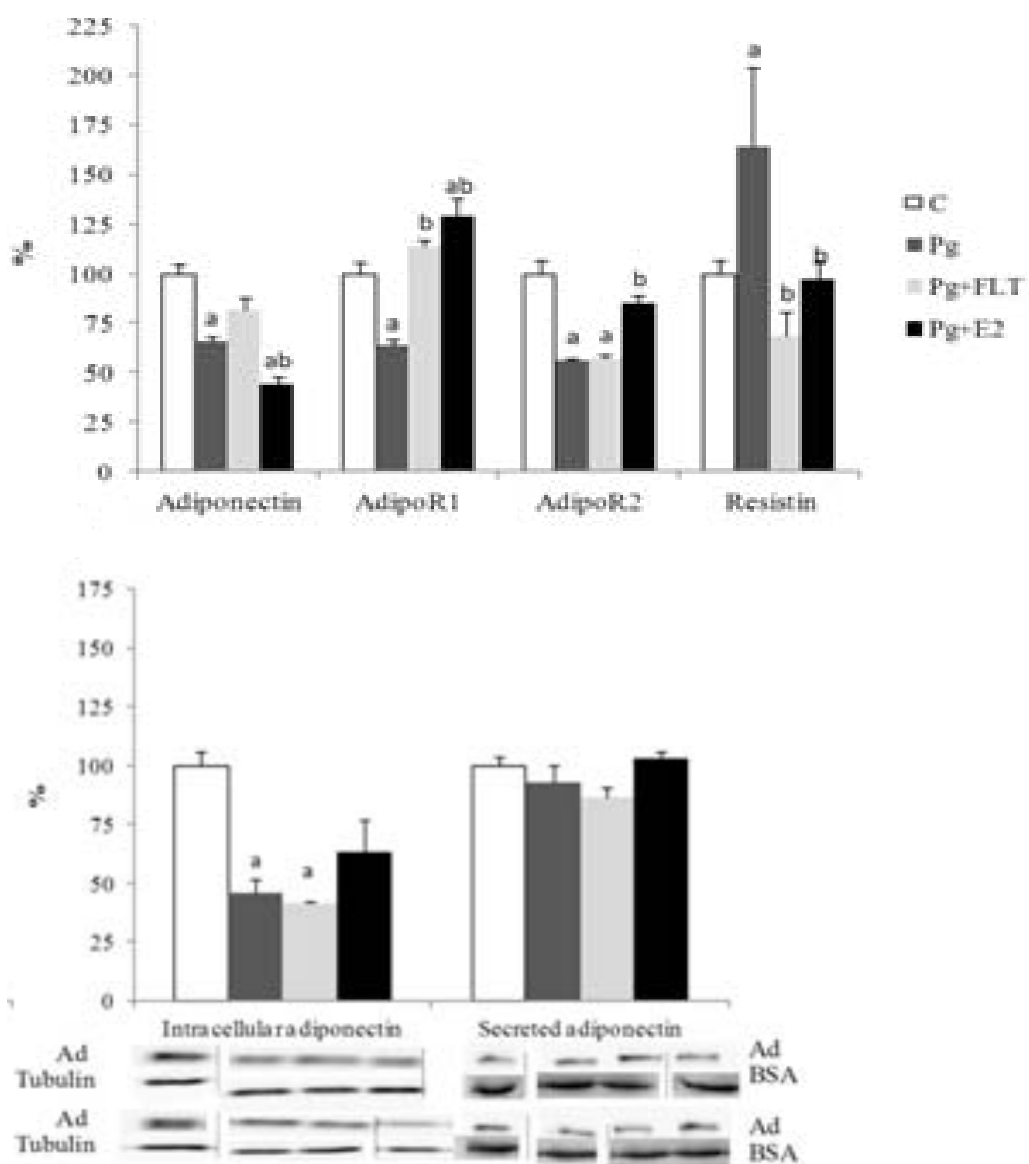


Figura 10b.- Efecto de la progesterona y sus tratamientos combinados con flutamida o con E2 sobre los niveles de expresión de adipocinas y receptores de adiponectina en los adipocitos 3T3-L1. Pg, progesterona; E2, 17beta-estradiol; AdipoR1 y AdipoR2, receptores de adiponectina 1 y 2; Ad, adiponectina; BSA, albúmina de suero bovino. Los valores están expresados como la media \pm SEM de 3 experimentos independientes realizados por duplicado ($n=6$). Los valores de las células control se establecieron como 100. Para analizar los valores de Ct normalizados respecto al 18S se utilizó el software Genex. Dos inmunoblots representativos se muestran bajo los gráficos correspondientes, y cuando las bandas del inmunoblot han sido agrupadas de diferentes partes del mismo gel se ha indicado con líneas en la figura. ANOVA de un factor ($p<0.05$) y análisis post hoc (LSD, $p<0.05$): a, diferencia significativa vs las células control; b, diferencia significativa vs las células tratadas con Pg.

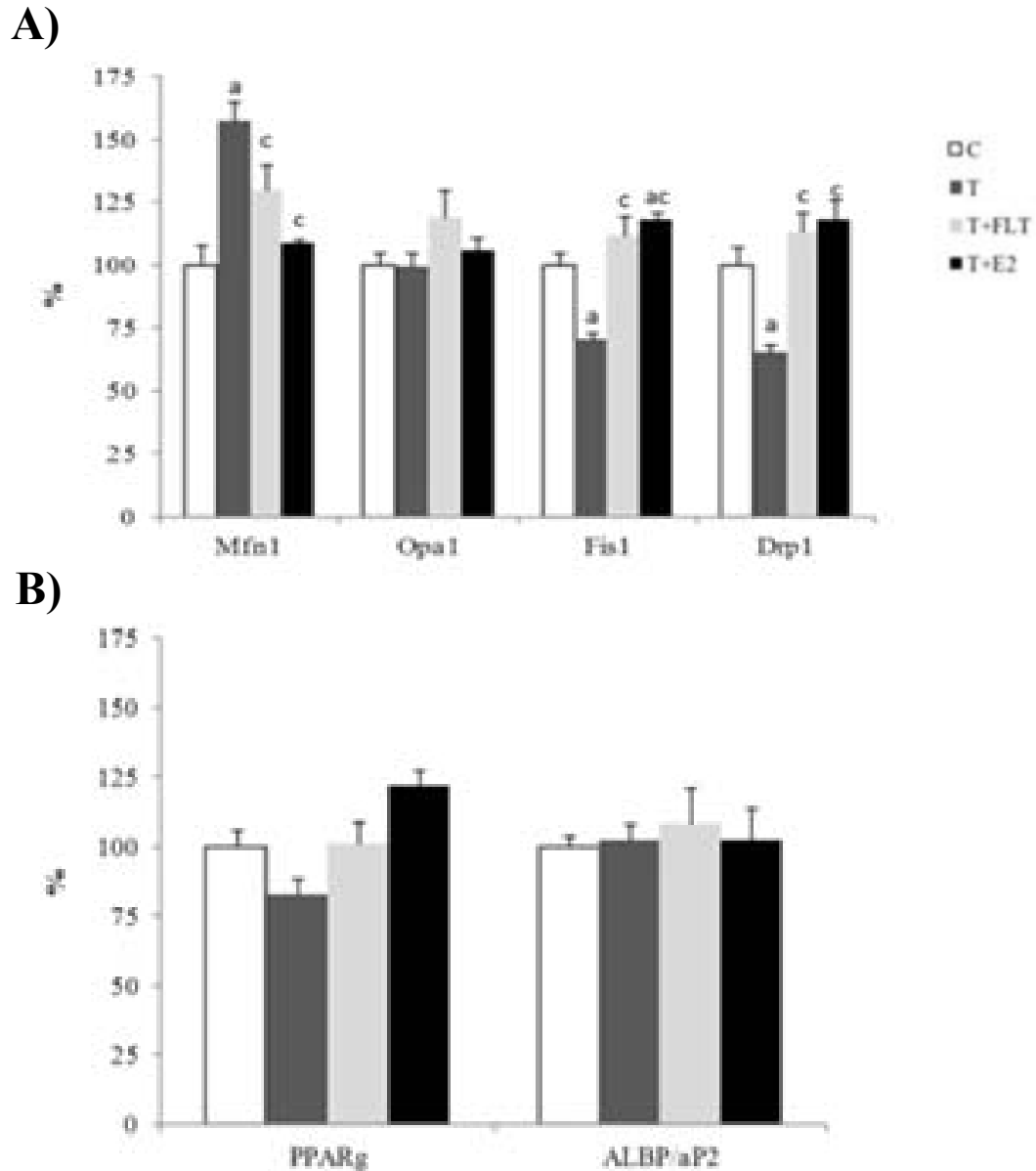


Figura 11a.- Efecto de la testosterona y sus tratamientos combinados con flutamida o con E2 sobre los niveles de expresión de marcadores de dinámica mitocondrial (A) y adipogénicos (B) en los adipocitos 3T3-L1. T, testosterona; E2, 17beta-estradiol; Mfn1, mitofusina 1; Opa1, proteína de atrofia óptica 1; Fis1, proteína de fisión 1; Drp1, proteína relacionada con la dinamina 1; Pparg, receptor activado por proliferadores de peroxisomas gamma; ALBP/aP2, proteína adipocítica de unión a lípidos aP2. Los valores están expresados como la media \pm SEM de 3 experimentos independientes realizados por duplicado (n=6). Los valores de las células control se establecieron como 100. Para analizar los valores de Ct normalizados respecto al 18S se utilizó el software Genex. ANOVA de un factor ($p < 0.05$) y análisis post hoc (LSD, $p < 0.05$): a, diferencia significativa vs las células control; c, diferencia significativa vs las células tratadas con T.

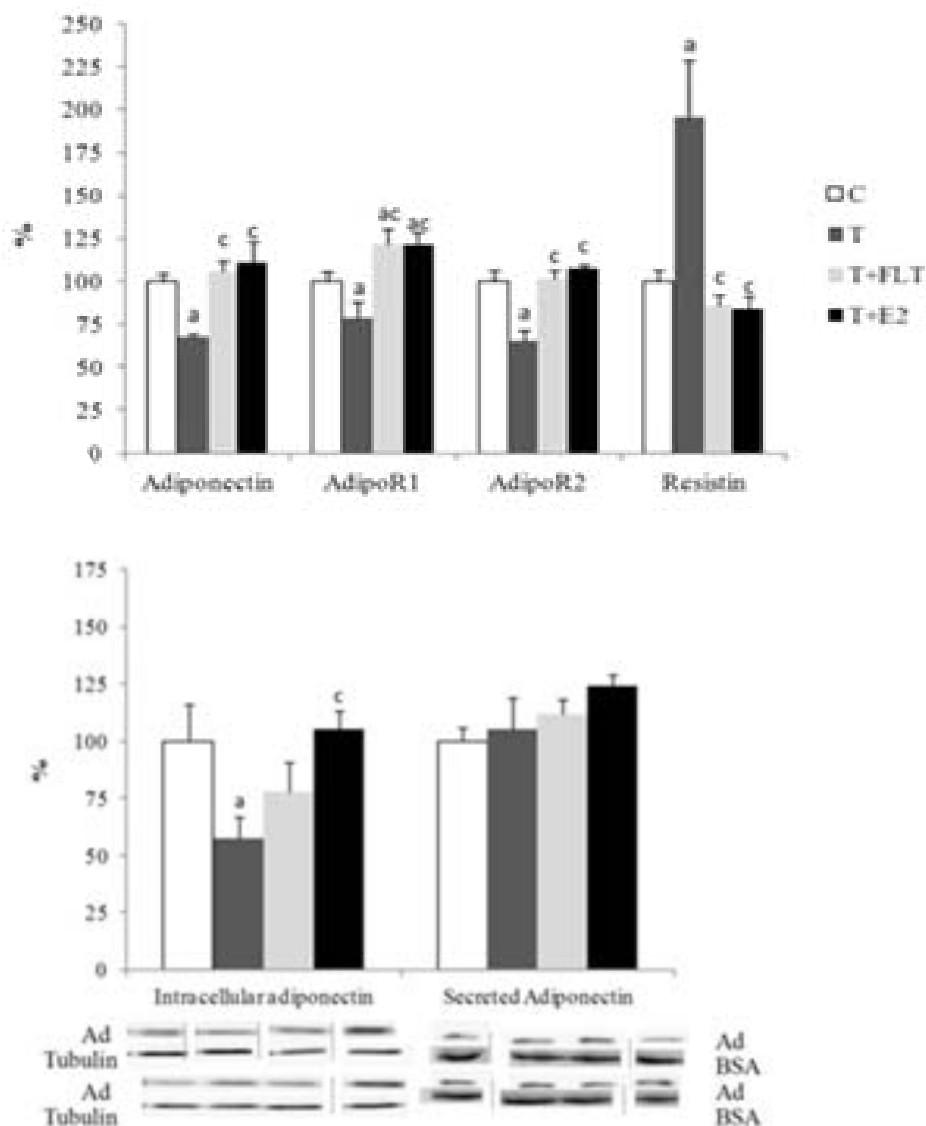


Figura 11b.- Efecto de la testosterona y sus tratamientos combinados con flutamida o con E2 sobre los niveles de expresión de adipoquinas y receptores de adiponectina en los adipocitos 3T3-L1. T, testosterona; E2, 17beta-estradiol; AdipoR1 y AdipoR2, receptores de adiponectina 1 y 2; Ad, adiponectina; BSA, albúmina de suero bovino. Los valores están expresados como la media \pm SEM de 3 experimentos independientes realizados por duplicado (n=6). Los valores de las células control se establecieron como 100. Para analizar los valores de Ct normalizados respecto al 18S se utilizó el software Genex. Dos immunoblots representativos se muestran bajo los gráficos correspondientes, y cuando las bandas del immunoblot han sido agrupadas de diferentes partes del mismo gel se ha indicado con líneas en la figura. ANOVA de un factor ($p < 0.05$) y análisis post hoc (LSD, $p < 0.05$): a, diferencia significativa vs las células control; c, diferencia significativa vs las células tratadas con T.

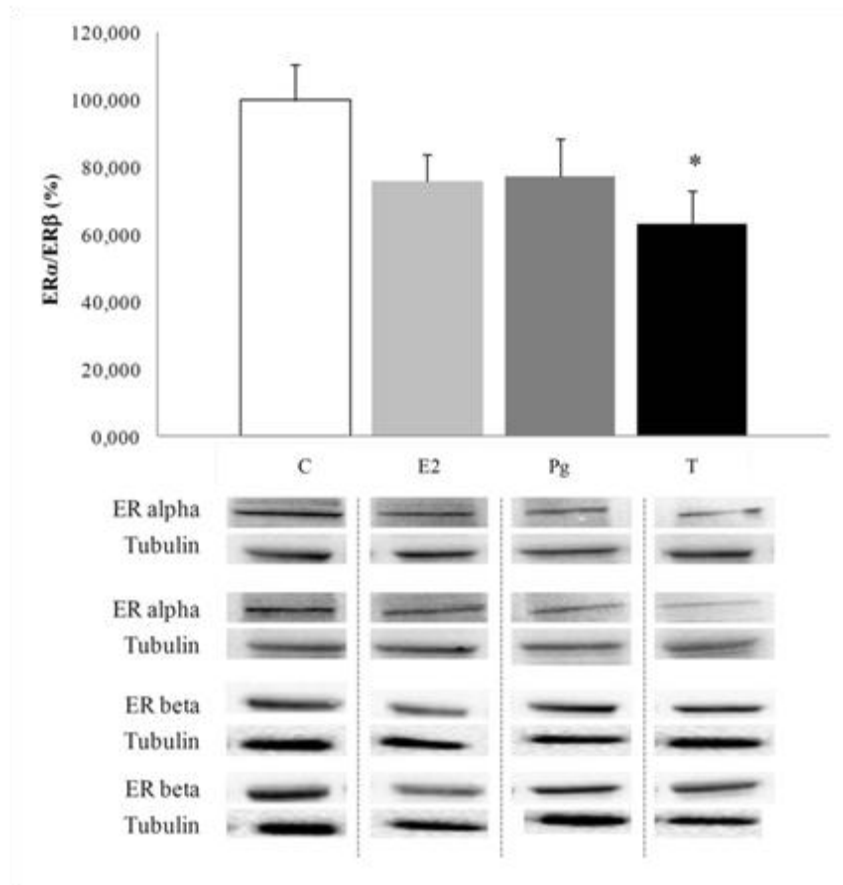


Figura 12.- Efecto de las hormonas sexuales sobre la relación de niveles de proteína de ERα frente a ERβ en adipocitos blancos 3T3-L1 e inmunoblot representativo. ERα, receptor de estrógenos alfa; ERβ, receptor de estrógenos beta; E2, 17beta-estradiol; Pg, progesterona; T, testosterona. Los valores están expresados como la media±SEM de 3 experimentos independientes realizados por duplicado (n=6). Los valores de las células control se establecieron como 100. Para analizar los valores de Ct normalizados respecto al 18S se utilizó el software Genex. Dos inmunoblots representativos se muestran bajo los gráficos correspondientes, y cuando las bandas del inmunoblot han sido agrupadas de diferentes partes del mismo gel se ha indicado con líneas en la figura. T-test ($p < 0.05$). *, indica diferencia vs las células control.

4.1.2. Discusión

La biogénesis mitocondrial (proliferación y diferenciación) es un proceso orientado a mantener una función mitocondrial óptima (Lee y Wei 2005). Nuestro estudio indica que el E2 induce proliferación mitocondrial en los adipocitos blancos (como muestran el aumento del ADNmt y de la masa mitocondrial) a través del aumento en la expresión tanto de *Pgc1a* como de *Pgc1b* y también de *Tfam*. El PGC1a está establecido como el regulador clave de la biogénesis mitocondrial. Actúa activando los NRFs que se unen y estimulan la expresión de genes nucleares que codifican proteínas mitocondriales, así como la expresión del *Tfam*, un factor involucrado en la regulación de la transcripción y replicación del genoma mitocondrial (Clayton 1992; Dairaghi, et al. 1995; Puigserver y Spiegelman 2003). En esta misma línea, el incremento de *Pgc1a* inducido por el E2 estimula también la diferenciación de los adipocitos 3T3-L1, como revelan el aumento en la expresión de *Cox4* y del contenido de cardiolipina. Estos resultados concuerdan con nuestros estudios previos *in vivo*, en los que describimos que el TAB de las ratas hembra muestra un mayor contenido mitocondrial que el de los machos, que está igualmente asociado a un incremento en la expresión de *Pgc1a* y de *Tfam* (Amengual-Cladera, et al. 2012a; Amengual-Cladera, et al. 2012).

Resulta interesante que los efectos de la T en la biogénesis mitocondrial sean opuestos a los observados para el E2. Este andrógeno promueve un descenso de la masa mitocondrial (medida por MTG y mediante la actividad CS) en los adipocitos 3T3-L1 en comparación con las células control que se acompaña de un descenso de *Pgc1b* y de *GABPA*, pero no de *Pgc1a*, lo que indicaría que los efectos de la T y del E2 sobre la biogénesis mitocondrial están mediados por vías de señalización diferentes. Además, el descenso de la relación entre los receptores de estrógenos (ERa/ERb) inducido por la T, concordaría con los efectos negativos de la T sobre la biogénesis mitocondrial, ya que ERb,

que se sabe que es activado por metabolitos de la T (Hiroi, et al. 2013), reprime la expresión de los NRF y de un subconjunto de genes de la cadena respiratoria mitocondrial (O'Lone, et al. 2007).

Los efectos opuestos del E2 y de la T en la biogénesis mitocondrial se hacen también evidentes en la dinámica mitocondrial. Junto con la biogénesis mitocondrial, la dinámica mitocondrial (procesos de fisión y de fusión) es crucial para la correcta función mitocondrial, e incluso defectos leves en la dinámica mitocondrial se asocian con el desarrollo de patologías tales como neuropatías, el hígado graso no alcohólico y la diabetes tipo 2 (Galloway and Yoon 2012; Liesa, et al. 2009; Zorzano, et al. 2009). Nosotros encontramos que el E2, que intensifica la biogénesis mitocondrial, estimula tanto la fusión como la fisión mitocondriales incrementando la expresión de *Opa1* y de *Drp1* respectivamente. De este modo, el E2 ayuda a mantener una dinámica mitocondrial activa y equilibrada en los adipocitos blancos que es clave para asegurar la correcta función mitocondrial y, por tanto, celular. Entretanto, la Pg y la T estimulan la expresión del marcador de fusión *Mfn1* y disminuyen la fisión a través del descenso de los niveles de ARNm de *Fis1* y de *Drp1*. Este predominio de la fusión sobre la fisión inducido por el tratamiento con T podría entenderse como un mecanismo para contrarrestar el deterioro de la función mitocondrial que había provocado esta hormona, ya que se ha observado que la estimulación de la fusión ayuda a preservar la función mitocondrial favoreciendo el intercambio de contenido entre mitocondrias (Detmer y Chan 2007).

Los efectos controvertidos de la Pg sobre la funcionalidad mitocondrial son notables, ya que promueve la proliferación mitocondrial y la fusión pero disminuye la diferenciación mitocondrial. Se ha reportado que los progestágenos en dosis elevadas pueden unirse a los receptores de andrógenos (AR), debido a su cercana relación con el receptor de Pg (Bardin, et al. 1983). La Pg puede además ser convertida en T en los adipocitos y de este modo

unirse a los AR. De hecho, hemos encontrado que tanto la Pg como la T actuarían sobre los marcadores de fisión mitocondrial a través de AR, mientras que la regulación del marcador de fusión *Mfn1* parece ser independiente de AR, ya que la adición de FLT, un bloqueante del AR (Labrie 1993), no previene el aumento de los niveles de ARNm de *Mfn1*. Resulta muy interesante que el E2 actúe reequilibrando la dinámica mitocondrial cuando se administra conjuntamente con T o con Pg, forzando a todos los marcadores a volver a los niveles de los controles. En los adipocitos 3T3-L1, el E2 también podría contrarrestar estímulos lesivos para la función mitocondrial. Así, los efectos del E2 sobre la dinámica mitocondrial serían más intensos en situaciones que implicaran un perjuicio de la función mitocondrial que en situaciones control con una completa funcionalidad mitocondrial. Estos hallazgos refuerzan nuestros resultados previos en un modelo de rata con disfunción mitocondrial inducida por la ingesta de una dieta rica en grasas que pusieron de manifiesto que la dinámica mitocondrial del TAB está debilitada en los machos pero no en las hembras, a las que el ambiente hormonal protegería de los efectos negativos de una dieta obesogénica (Amengual-Cladera et al. 2012).

La adiponectina es una hormona insulino-sensibilizante que modula el gasto energético y la ingesta calórica (Galic, et al. 2010), y cuya síntesis se ha relacionado con la función mitocondrial en el TAB (Koh, et al. 2007; Wang, et al. 2013). De acuerdo con esta idea, el aumento de la proliferación y de la diferenciación mitocondriales inducidas por E2 van en paralelo con un incremento de la síntesis y secreción de adiponectina en los adipocitos 3T3-L1. En nuestro estudio el E2 induce también un aumento en el estado de diferenciación (reflejado por el aumento del marcador adipogénico *ALBP/aP2*) que podría estar relacionado con el aumento en la expresión de adiponectina, ya que se sabe que la adiponectina ejerce acciones autocrinas en los adipocitos blancos, regulando la secreción de citoquinas (Dietze-

Schroeder, et al. 2005) y actuando como un factor de diferenciación (Fu, et al. 2005). El tratamiento con T sugiere también una conexión entre la función mitocondrial y la síntesis de adiponectina, ya que se observa un descenso inducido por T en la expresión de adiponectina y sus receptores que es consistente con la ya mencionada reducción de la biogénesis mitocondrial en respuesta al tratamiento con T. Dicho descenso en la expresión de adiponectina podría estar mediado por la disminución de los niveles de ARNm de *Pparg*, ya que el promotor de la adiponectina presenta elementos de respuesta al PPAR, y PPAR α es un factor clave para la adipogénesis (Fu et al. 2005; Iwaki, et al. 2003). De hecho, se ha descrito que la T ejerce efectos directos en la secreción de adiponectina, ya que las concentraciones séricas de adiponectina total y HMW son muy elevadas en roedores castrados y en hombres hipogonadales y disminuyen tras la terapia con T (Nishizawa, et al. 2002; Xu, et al. 2005). Dado que la coadministración de E2 y T revierte la caída en la expresión de adiponectina y de sus receptores restaurando la situación control, el E2 estaría actuando de nuevo como un factor reequilibrador en una situación de disfunción celular, tal y como ocurría con la disfunción mitocondrial.

En conclusión, nuestro estudio demuestra la participación del E2 en la estimulación de la biogénesis mitocondrial en los adipocitos blancos, mientras que la T tendría efectos opuestos. Estas alteraciones en las capacidades mitocondriales son en ambos casos paralelos a las variaciones en la expresión de adiponectina, lo que sugiere la existencia de una conexión entre la biogénesis mitocondrial y la síntesis de adiponectina en los adipocitos blancos que estaría modulado por las hormonas sexuales. Estos datos apoyan y amplían nuestras previas observaciones *in vivo*, en las que se describe una mejor función mitocondrial en TAB de ratas hembra que en el de los machos, acompañada por una mayor expresión de adiponectina (Amengual-Cladera et al. 2012a; Amengual-Cladera, et al. 2012b; Amengual-Cladera et al. 2012). El

E2 estimula además la dinámica mitocondrial, mientras que la T favorece la fusión sobre la fisión, probablemente en un intento de contrarrestar la disfunción mitocondrial provocada por este andrógeno. Además, el E2 actuaría como un equilibrador de la biogénesis y la dinámica mitocondriales en situaciones que implican disfunción mitocondrial, como el tratamiento con T, lo que está de acuerdo con nuestros resultados *in vivo* que indican que la disfunción mitocondrial inducida por una dieta rica en grasas altera menos el perfil de adiponectina de las ratas hembra que el de los machos (Amengual-Cladera et al. 2012a; Amengual-Cladera et al. 2012).

4.2. EFECTO DEL ESTRADIOL SOBRE LA BIOGÉNESIS MITOCONDRIAL Y LA EXPRESIÓN DE ADIPONECTINA EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO

Los resultados presentados y discutidos en este apartado provienen de los datos obtenidos a partir del músculo esquelético de las ratas sometidas al experimento OVARIECTOMÍA así como de los cultivos de miotubos L6E9 tratados con hormonas sexuales. El objetivo en el que se focaliza es el de esclarecer el papel de las hormonas sexuales en las diferencias de sexo previamente observadas en el músculo esquelético.

4.2.1. Resultados

Efecto de la ovariectomía y el reemplazo de E2 sobre los niveles circulantes de hormonas sexuales, adipocinas y NEFA

La ovariectomía indujo un descenso en los niveles séricos de E2 y de progesterona, aunque sólo en esta última resultó estadísticamente significativo (Tabla 9). Con la administración de E2, los niveles de ambas hormonas aumentaron, pero mientras que la progesterona no alcanzó sus niveles control, el E2 los superó en más de dos veces. La ovariectomía no produjo cambios en la concentración de adiponectina circulante, mientras que la de resistina aumentó. Con el reemplazo de E2 disminuyeron los niveles séricos tanto de adiponectina como de resistina. Los valores circulantes de NEFA no se vieron afectados ni por la OVX ni por la administración de E2.

Efecto de la ovariectomía y del reemplazo de E2 sobre el peso corporal y del músculo gastrocnemius, en el índice de adiposidad y en la composición del músculo gastrocnemius blanco

La ovariectomía provocó un aumento del peso corporal (36%) y del músculo gastrocnemius (39%) en comparación con las ratas control (Tabla 10). Aunque

el reemplazo de E2 causó un descenso del 19% en ambos parámetros en comparación con el grupo OVX, los valores permanecieron por encima de los controles. El índice de adiposidad también aumentó con la ovariectomía, y el tratamiento con E2 revirtió dicho aumento. Los niveles de TAG y de ADN no se vieron modificados ni por la ovariectomía ni por la administración de E2, pero el contenido proteico incrementó con la administración de E2.

Efecto de la ovariectomía y del reemplazo de E2 sobre los marcadores de capacidad oxidativa mitocondrial en el músculo gastrocnemius blanco

El consumo de oxígeno de las miofibras utilizando glutamato/malato como sustrato fue menor en el grupo OVX que en el control (Tabla 11), pero la administración de E2 revirtió este descenso, aunque sin alcanzar significancia estadística ($p=0.050$). Las actividades COX y CS, así como los niveles de proteína COX 4 (Tabla 11, inmunoblots representativos en la Figura 13), no se vieron alterados con la castración pero con la administración de E2 aumentaron superando los valores control. Los niveles de ARNm de *Cpt1m* (carnitina palmitoil transferasa) no se vieron afectados por la manipulación hormonal.

Efecto de la ovariectomía y del reemplazo de E2 sobre los marcadores de estrés oxidativo del músculo gastrocnemius blanco

La formación de H_2O_2 en las miofibras permeabilizadas se midió en estado 4 utilizando glutamato/malato como sustrato (Tabla 12). Las miofibras de los grupos ovariectomizados generaron más H_2O_2 que las de los controles, y este aumento se acompañó de una mayor actividad GPx. La actividad SOD del músculo gastrocnemius blanco y la TAC del suero no resultaron alteradas por las manipulaciones hormonales. La oxidación de proteínas (grupos carbonilo) y de lípidos (HNE) disminuyeron en el grupo OVX+E2 al compararlo con los animales castrados. Los niveles de proteína UCP3 descendieron con la

ovariectomía y retornaron a los valores control con la administración de E2 (Tabla 12, inmunoblots representativos en la Figura 13).

Efecto de la ovariectomía y del reemplazo de E2 sobre la expresión de marcadores de función, biogénesis y dinámica mitocondriales en el músculo gastrocnemius blanco

La ovariectomía provocó un descenso de los niveles de ARNm de los principales marcadores de la biogénesis mitocondrial, *Pgc1a* y *Tfam* (Tabla 13), así como de los niveles de proteína de los marcadores de dinámica mitocondrial MFN1, MFN2 y OPA1, y de DRP1, aunque estos últimos no alcanzaron significancia estadística ($p=0.054$) (Tabla 13, inmunoblots representativos en la Figura 13). Esta disminución se revirtió con la administración de E2 en todos los parámetros de la biogénesis y la dinámica excepto para OPA1. La expresión de *Nrf1*, *Sirt1* y *Sirt3* (sirtuinas 1 y 3) no se vio afectada por la OVX pero aumentó con la administración de E2.

Efecto de los tratamientos hormonales sobre los marcadores de biogénesis mitocondrial en los miotubos L6E9

La intensidad de la tinción con MTG se utilizó como indicador de la masa mitocondrial de los miotubos L6E9 (Figura 14). Los tratamientos con E2 y con Pg aumentaron tanto la masa mitocondrial (Figura 14A y 14B) y la expresión de *Pgc1a* (Figura 14C). Los niveles de ARNm de *Tfam* también se incrementaron en los miotubos tratados con E2 (Figura 14D). No se observaron efectos del tratamiento con T sobre ninguno de estos parámetros.

Efecto de la manipulación hormonal sobre los niveles de adiponectina, AdipoR1 y APPL1 en el músculo gastrocnemius blanco y en los miotubos L6E9

La ovariectomía disminuyó la expresión de adiponectina en el músculo gastrocnemius blanco (Figura 15A), así como los niveles de proteína de AdipoR1 siendo estos últimos completamente restaurados a los niveles

control con la administración de E2 (Figura 15B). Los niveles de ARNm de *APPL1* (proteína adipocítica de unión a lípidos aP2) descendieron con la ovariectomía, aunque sin alcanzar significancia estadística ($p=0.052$), y el reemplazo de E2 restableció la expresión de *APPL1* a los niveles control (Figura 15C). En los miotubos L6E9, los tratamientos con E2 y con Pg aumentaron la expresión de adiponectina (Figura 15D). Los niveles de ARNm de *AdipoR1* también se incrementaron con el tratamiento con E2 pero disminuyeron en las células tratadas con T (Figura 15E). Así mismo, los niveles de ARNm de *APPL1* disminuyeron con el tratamiento con T, aunque el tratamiento con E2 no produjo ningún efecto (Figura 15F).

Tabla 9.- Efecto de la ovariectomía y del reemplazo de estradiol sobre los niveles séricos de hormonas sexuales, adipoquinas y NEFA

	Control	OVX	OVX+E2	ANOVA
17beta-estradiol (UA)	100±24	61.3±9.7	240±103ab	H
Progesterona (ng/mL)	24.6±2.1	3.42±1.28a	10.7±2.3ab	H
Adiponectina (µg/mL)	39.9±4.7	44.4±3.4	22.6±0.3ab	H
Resistina (ng/mL)	137±16	250±20a	177±23b	H
NEFA (mmol/L)	0.891±0.034	0.777±0.018	0.886±0.105	NS

OVX, ratas ovariectomizadas; OVX+E2, ratas ovariectomizadas tratadas con 17beta-estradiol; NEFA, ácidos grasos libres. La concentración de E2 está expresada en unidades arbitrarias (UA) con los valores de los animales control establecidos como 100. Los valores están expresados como la media±SEM de 6 animales por grupo. ANOVA (p<0.05): H efecto hormona, NS no significativo. Post-hoc (LSD, p<0.05): a, indica diferencia respecto a los Control; b, indica diferencia respecto a los OVX.

Tabla 10.- Efecto de la ovariectomía y del reemplazo de estradiol sobre el peso corporal y el peso del gastrocnemius, el índice de adiposidad y la composición del músculo gastrocnemius blanco

	Control	OVX	OVX+E2	ANOVA
Peso corporal (g)	219±5	298±6a	242±5ab	H
Índice de adiposidad (%)	4.80±0.68	7.27±0.44a	5.30±0.28b	H
Peso del gastrocnemius (g)	2.64±0.05	3.67±0.05a	2.94±0.02ab	H
(g/100g PC)	1.22±0.01	1.24±0.01	1.25±0.03	NS
Proteína (mg/g tejido)	43.3±1.1	42.6±0.7	47.8±0.9ab	H
TAG (mg/g tejido)	16.5±2.7	31.3±4.8	23.2±4.4	NS
ADN (mg/g tejido)	0.298±0.031	0.281±0.027	0.374±0.039	NS

OVX, ratas ovariectomizadas; OVX+E2, ratas ovariectomizadas tratadas con 17beta-estradiol; PC, peso corporal; TAG, triacilglicéridos. El peso del gastrocnemius representa el peso total del músculo (rojo más blanco). El índice de adiposidad es la suma de los depósitos grasos blancos gonadal, retroperitoneal y mesentéricos relativa a 100 g de PC. Los valores están expresados como la media±SEM de 6 animales por grupo. ANOVA (p<0.05): H efecto hormona, NS no significativo. Post-hoc (LSD, p<0.05): a, indica diferencia respecto a los Control; b, indica diferencia respecto a los OVX.

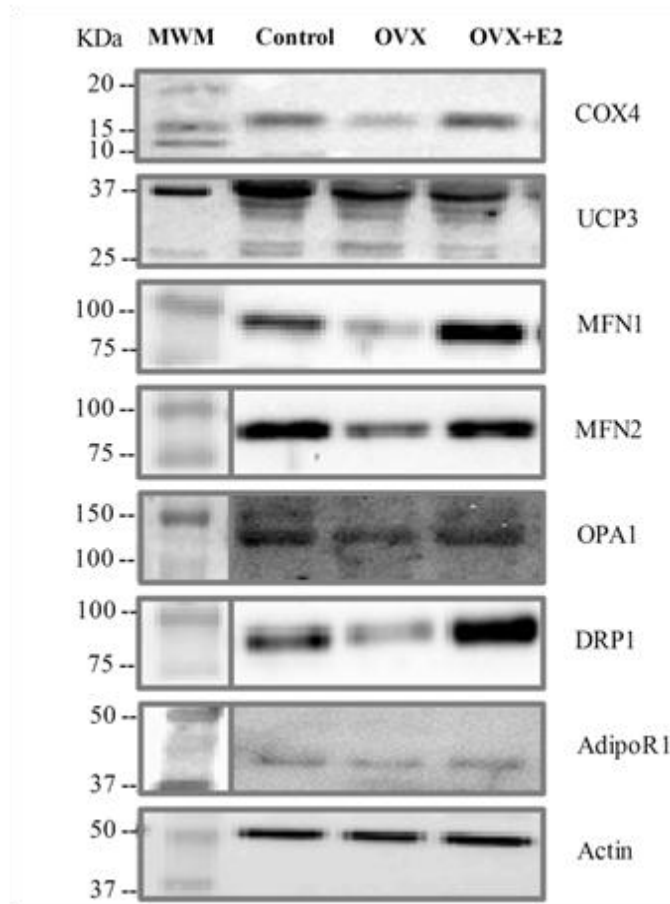


Figura 13.- Inmunoblots representivos de las determinaciones realizadas en homogenado de músculo gastrocnemius blanco. MWM, molecular weight mass, masa molecular; C, control; OVX, ratas ovariectomizadas; OVX+E2, ratas ovariectomizadas tratadas con 17beta-estradiol; COX4, subunidad 4 de la citocromo c oxidasa; UCP3, proteína desacoplante 3; MFN1, mitofusina 1; MFN2, mitofusina 2; OPA1, proteína de atrofia óptica 1; DRP1, proteína relacionada con la dinamina 1; AdipoR1, receptor de adiponectina 1. Cuando las bandas del inmunoblot han sido agrupadas de diferentes partes del mismo gel se ha indicado con líneas en la figura. Cada proteína se cuantificó en relación al control de carga de su mismo gel, pero solo se muestra un inmunoblot representativo de la actina.

Tabla 11.- Efecto de la ovariectomía y del reemplazo de estradiol sobre los marcadores de capacidad oxidativa mitocondrial en el músculo gastrocnemius blanco

	Control	OVX	OVX+E2	ANOVA
Consumo O ₂ (VO ₂ /min·UI CS)	137 ± 17	44.9 ± 3.9a	85.6 ± 20.9a	H
Actividad CS (mIU/g tejido)	3.00 ± 0.22	3.08 ± 0.19	3.86 ± 0.09ab	H
Actividad COX (AU/mg tejido)	100 ± 13	113 ± 12	158 ± 12ab	H
COX4 (%)	100 ± 18	84.9 ± 12.6	152 ± 7ab	H
<i>Cpt1m</i> ARNm (normalizado)	1.61 ± 0.17	1.49 ± 0.13	2.07 ± 0.12	NS

OVX, ratas ovariectomizadas; OVX+E2, ratas ovariectomizadas tratadas con 17beta-estradiol; CS, citrato sintasa; COX, citocromo c oxidasa; COX4, COX subunidad 4; *Cpt1m*, carnitin-palmitoil transferasa 1m; UA, unidades arbitrarias. Para la medida del consumo de O₂ se utilizó glutamato/malato como sustrato. La actividad CS está expresada en unidades internacionales (μmol/min). En los datos de ARNm, el software Genex se usó para normalizar los valores de Ct a los de 18S. Los valores están expresados como la media±SEM de 6 animales por grupo. ANOVA (p<0.05): H efecto hormona, NS no significativo. Post-hoc (LSD, p<0.05): a, indica diferencia respecto a los Control; b, indica diferencia respecto a los OVX.

Tabla 12.- Efecto de la ovariectomía y del reemplazo de estradiol sobre los marcadores de estrés oxidativo en el músculo gastrocnemius blanco

	Control	OVX	OVX+E2	ANOVA
Producción de H ₂ O ₂ (pmolH ₂ O ₂ /UI CS·min)	0.035 ± 0.008	0.116 ± 0.006a	0.122 ± 0.032a	H
TAC (nmol Trolox/μl suero)	81.4 ± 4.4	78.8 ± 1.7	84.9 ± 5.4	NS
GPx (UI/g tejido)	0.363 ± 0.036	0.490 ± 0.041a	0.521 ± 0.041a	H
SOD (UI/g tejido)	1.08 ± 0.11	0.969 ± 0.049	1.12 ± 0.02	NS
4HNE (%)	100 ± 8	112 ± 4	94.6 ± 2.7b	H
Grupos carbonilo (%)	100 ± 4	104 ± 12	91.9 ± 0.45b	H
UCP3 (%)	100 ± 10	56.3 ± 6.4a	84.7 ± 4.6b	H

OVX, ratas ovariectomizadas; OVX+E2, ratas ovariectomizadas tratadas con 17beta-estradiol; CS, citrato sintasa; GPx, glutatión peroxidasa; SOD, superóxido dismutasa; TAC, capacidad antioxidante total; 4-HNE, 4-hidroxinonal; UCP3, proteína desacoplante 3. Las actividades SOD y GPx están expresadas en unidades internacionales (μmol/min). Como sustrato para medir la producción de H₂O₂ se utilizó glutamato/malato. Los valores están expresados como la media±SEM de 6 animales por grupo. ANOVA (p<0.05): H efecto hormona, NS no significativo. Post-hoc (LSD, p<0.05): a, indica diferencia respecto a los Control; b, indica diferencia respecto a los OVX.

Tabla 13.- Efecto de la ovariectomía y del reemplazo de estradiol sobre la expresión de los marcadores de función, biogénesis y dinámica mitocondriales en el músculo gastrocnemius blanco

	Control	OVX	OVX+E2	ANOVA
<i>Niveles de ARNm (normalizados)</i>				
<i>Pgc1a</i>	2.01 ± 0.23	1.44 ± 0.18a	2.17 ± 0.19b	H
<i>Nrf1</i>	1.50 ± 0.08	1.51 ± 0.13	1.97 ± 0.15ab	H
<i>Tfam</i>	5.52 ± 0.03	3.07 ± 0.57a	4.96 ± 0.50b	H
<i>Sirt1</i>	1.61 ± 0.10	1.42 ± 0.12	2.18 ± 0.09ab	H
<i>Sirt3</i>	1.37 ± 0.06	1.24 ± 0.07	1.58 ± 0.07ab	H
<i>Niveles de proteínas (unidades arbitrarias)</i>				
MFN1	100 ± 3	54.4 ± 10.5a	114 ± 4ab	H
MFN2	100 ± 12	59.8 ± 10.5a	103 ± 11b	H
OPA1	100 ± 3	79.3 ± 7.1a	84.9 ± 2.1	H
DRP1	100 ± 25	37.6 ± 5.9	141 ± 16b	H

OVX, ratas ovariectomizadas; OVX+E2, ratas ovariectomizadas tratadas con 17beta-estradiol; Pgc1a, coactivador 1 alfa del receptor activado por proliferadores peroxisomales gamma; Tfam, factor de transcripción nuclear A; Sirt 1 y 3, sirtuinas 1y 3; MFN1 y 2, mitofusinas 1 y 2; OPA1, proteína de atrofia óptica 1; DRP1, proteína relacionada con la dinamina 1. El software Genex se utilizó para normalizar los valores de Ct al 18S. Los niveles de proteína están expresados como unidades arbitrarias por mg de proteína total y los valores control se establecieron como 100. Los valores están expresados como la media±SEM de 6 animales por grupo. ANOVA (p<0.05): H efecto hormona, NS no significativo. Post-hoc (LSD, p<0.05): a, indica diferencia respecto a los Control; b, indica diferencia respecto a los OVX.

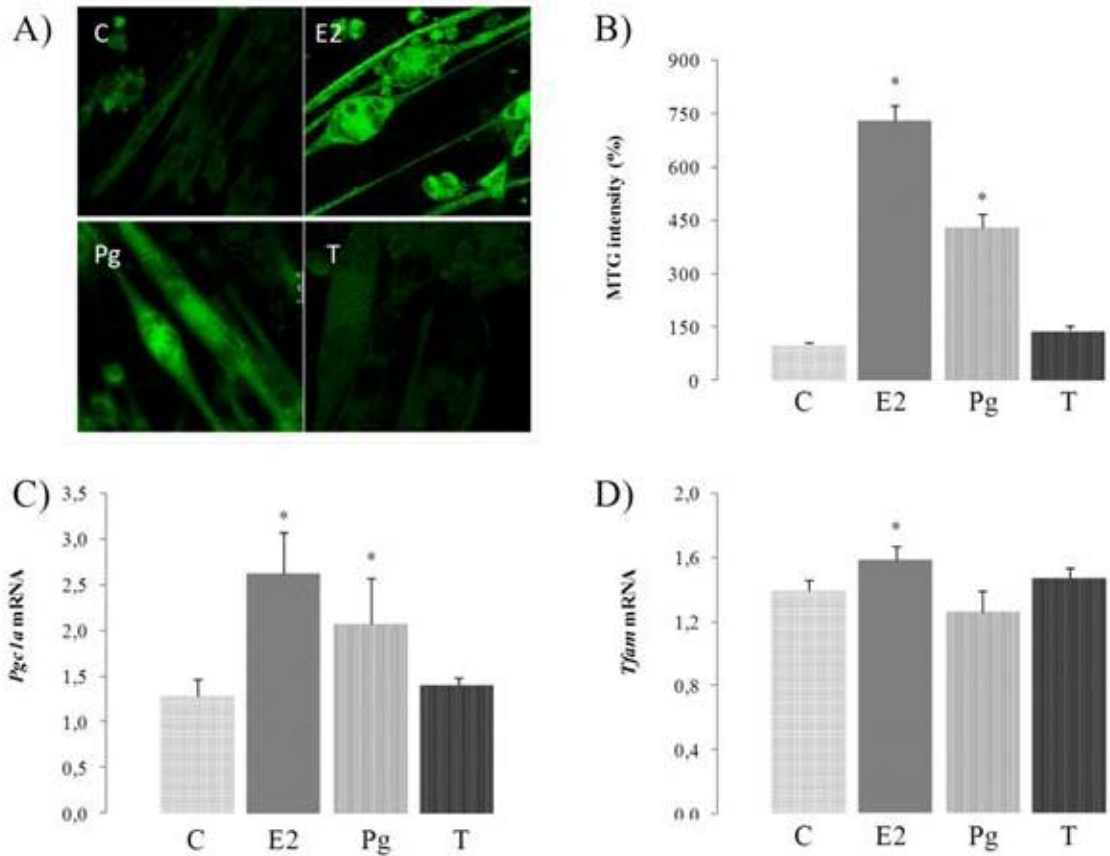


Figura 14.- Efecto de las hormonas sexuales sobre la masa mitocondrial y los marcadores de biogénesis en miotubos L6E9 (A) Tinción mitocondrial de miotubos L6E9 tratados con E2, Pg o T (B) Cuantificación de la fluorescencia del MTG en los miotubos L6E9. (C, D) Niveles de ARNm de Pgc1a y Tfam en miotubos L6E9. MTG, Mitotracker Green; C, control; E2, 17beta-estradiol; Pg, progesterona; T, testosterona; Pgc1a, coactivador 1 alfa del receptor activado por proliferadores de peroxisomas gamma; Tfam, factor de transcripción mitocondrial A. Para la cuantificación de la fluorescencia, el valor de las células control se estableció como 100. Para analizar los valores de Ct normalizados respecto al 18S se utilizó el software Genex. Los valores están expresados como la media \pm SEM de 3 experimentos independientes realizados por duplicado (n=6). T-test (p<0.05): *, indica diferencia vs las células control.

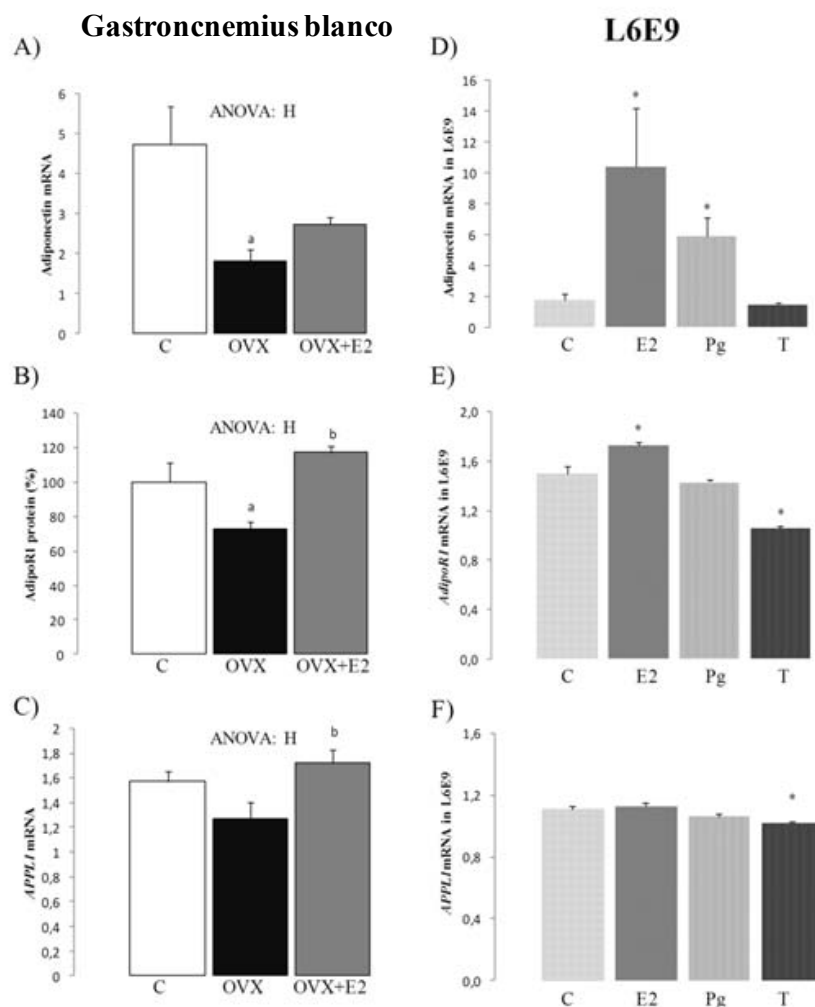


Figura 15.- Efecto de la ovariectomía y del reemplazo de estradiol sobre los niveles de ARNm de adiponectina (A) y de APPL1 (C) y sobre los niveles de proteína AdipoR1 (B) en el músculo gastrocnemius blanco. Efecto de la administración de hormonas sexuales sobre los niveles de ARNm de adiponectina (A), AdipoR1 (D) y APPL1 (F) en miotubos L6E9. OVX, ratas ovariectomizadas; OVX+E2, ratas ovariectomizadas tratadas con 17beta-estradiol; C, control; E2, 17beta-estradiol; Pg, progesterona; T, testosterona; AdipoR1, receptor de adiponectina 1; APPL1, Proteína adaptadora con un dominio PH, PTB y motivo de cremallera de leucina 1. Los niveles de proteína se expresan como unidades arbitrarias por mg de proteína, con los valores control establecidos como 100. Para el ARNm se utilizó el software Genex para analizar los valores de Ct normalizados respecto al 18S. Los valores en (A), (B) y (C) están expresados como la media±SEM de 6 animales por grupo. El efecto hormona se analizó con una ANOVA de un factor ($p < 0.05$): H indica efecto hormonal y NS no significativo. Post-hoc (LSD, $p < 0.05$): a, indica diferencia del grupo Control; b, indica diferencia del grupo OVX. En (D), (E) y (F) los miotubos L6E9 fueron tratados con E2 (10nM), Pg o T (1µM ambas). Las células control se trataron con el volumen equivalente de vehículo. Los valores están expresados como la media±SEM de 3 experimentos independientes realizados por duplicado ($n=6$). T-test ($p < 0.05$): *, indica diferencia vs las células control.

4.2.2. Discusión

Estudios previos han demostrado que el músculo esquelético de ratas hembra muestra una mayor diferenciación y contenido mitocondriales acompañados por una mayor capacidad OXPHOS y una mejor respuesta antioxidante que el de los machos, lo que explicaría la mayor capacidad de las hembra a adaptarse a situaciones en las que el metabolismo energético está alterado (Colom, et al. 2007; Gómez-Pérez, et al. 2012). Además, este dimorfismo sexual en la funcionalidad mitocondrial se ha asociado con la mayor susceptibilidad de las ratas macho a desarrollar resistencia muscular a la insulina en respuesta tanto al envejecimiento (Gómez-Pérez, et al. 2011) como a la ingesta de dietas obesogénicas (Gómez-Pérez et al. 2012). En el presente estudio utilizamos ratas ovariectomizadas para evaluar los efectos de un descenso en las hormonas ováricas y del reemplazo de E2 sobre la función mitocondrial y la expresión de adiponectina del músculo esquelético. Para identificar el papel específico de las hormonas sexuales, tratamos cultivos de miotubos L6E9 con E2, Pg o T. Nuestros resultados confirman el papel del E2 en el mantenimiento de una correcta funcionalidad mitocondrial del músculo esquelético, y apoyan la idea de una modulación de la expresión de adiponectina mediada por el E2, un hecho que apunta a la existencia de una conexión entre la función mitocondrial y la expresión de adiponectina en el músculo esquelético.

En este estudio transcurrieron más de dos meses desde la ovariectomía hasta el sacrificio de los animales, lo que explicaría la ausencia de un descenso significativo de los niveles séricos de E2 en los animales ovariectomizados, un hecho que ya se ha descrito previamente (Amengual-Cladera, et al. 2012b; Nadal-Casellas, et al. 2011; Pantaleao, et al. 2010). Resulta plausible considerar que en las hembras OVX se habrían activado mecanismos compensatorios para aliviar los efectos de la ovariectomía. En este sentido, vale la pena señalar

que se ha demostrado que en hembras jóvenes la producción de estrógenos se traslada de los ovarios a localizaciones extragonadales cuando la función ovárica falla (Simpson 2003). Además, estudios previos muestran que la concentración de estrógenos circulante aumenta gradualmente con el tiempo tras la ovariectomía en ratas, lo que ha sido atribuido, entre otros factores, a un aumento de la actividad aromatasa del tejido adiposo (Zhao, et al. 2005).

La biogénesis mitocondrial comprende tanto la proliferación (aumento del contenido mitocondrial) como la diferenciación (mejora de las capacidades mitocondriales) (Attardi y Schatz 1988). Nuestros datos muestran una estimulación de la biogénesis mitocondrial inducida por el E2 en el músculo esquelético de rata. Hemos observado que el reemplazo de E2 en las ratas ovariectomizadas induce un incremento de los niveles de ARNm de *Pgc1a*, un regulador clave de la biogénesis mitocondrial (Puigserver y Spiegelman 2003). En concordancia con este incremento de *Pgc1a*, los niveles de ARNm de *Tfam* y de *Nrf1* aumentaron en respuesta a la administración de E2. El *Tfam* resulta activado por el *Pgc1a* a través de la inducción de la expresión de *Nrf1* (Wu, et al. 1999), y sus productos dirigen la transcripción y la replicación del ADNmt (Ventura-Clapier, et al. 2008). Este papel estimulador del E2 en la proliferación mitocondrial está respaldado por nuestros resultados *in vitro*, ya que el tratamiento de los miotubos L6E9 con E2 aumenta la masa mitocondrial, probablemente a través del incremento de *Pgc1a*, ya que ambos parámetros muestran el mismo perfil. El tratamiento con Pg produce el mismo efecto que con el E2 aunque a un menor nivel, mientras que la T no parece estar involucrada en la estimulación de la proliferación mitocondrial del músculo esquelético.

El incremento de la proliferación mitocondrial inducido por el E2 es paralelo a la mayor capacidad oxidativa que muestran los animales tratados con E2 (indicado por las actividades COX y CS y por los niveles de proteína COX4),

que se acompaña de una ligera recuperación del consumo de oxígeno. Estos datos apoyan la idea de que el E2 estimula también la diferenciación mitocondrial en el músculo esquelético. El aumento descrito en la capacidad oxidativa podría deberse al previamente mencionado incremento de los niveles de ARNm de *Nrf1*, ya que este factor induce la expresión de genes nucleares que codifican para proteínas mitocondriales (Scarpulla 2011), así como a la estimulación de la expresión del ARNm de *Sirt3* que encontramos en las ratas OVX+E2, pues esta proteína está involucrada en la regulación de subunidades de la cadena respiratoria mitocondrial a través de la acetilación reversible de residuos de lisina (Lombard, et al. 2007; Schwer, et al. 2006).

El reemplazo de E2 provocó también una reducción en los marcadores de estrés oxidativo en comparación con los animales ovariectomizados, a pesar de su mayor producción de H₂O₂. Esto puede atribuirse al mantenimiento de las actividades SOD y GPx, así como al restablecimiento de los niveles de proteína UCP3 inducida por el E2. De hecho, se ha propuesto que la UCP3 juega un papel relevante en la protección contra los ROS en el músculo esquelético (Brand, et al. 2002; Vidal-Puig, et al. 2000), y las hembras muestran mayor habilidad para contrarrestar el desarrollo de patologías asociadas al estrés oxidativo inducidas por una dieta rica en grasas en parte gracias a una mayor expresión de UCP3 (Gómez-Pérez, et al. 2008). Además, no se puede descartar el papel antioxidante intrínseco del E2 (Ayres, et al. 1996), especialmente considerando la elevada concentración sérica de E2 alcanzada por los animales OVX+E2. Por otra parte, la función mitocondrial y la respuesta al estrés oxidativo pueden verse fuertemente afectadas por la composición de las fibras musculares (Anderson y Neuffer 2006; Picard, et al. 2008; Picard, et al. 2012). Se ha descrito que la ovariectomía modifica las propiedades contráctiles, el fenotipo, el metabolismo y la capacidad de generación de fuerza del músculo (Liu, et al. 2009c; Moran, et al. 2006), y el reemplazo de estradiol revierte estas alteraciones (Cavalcanti-de-Albuquerque,

et al. 2014; Liu, et al. 2009b; Moran, et al. 2007). En este sentido, no se puede descartar que los cambios observados en la función mitocondrial y la respuesta al estrés oxidativo del gastrocnemius blanco de las ratas OVX y OVX+E2 estén mediados por cambios en el metabolismo o el fenotipo de las fibras musculares, pero serían necesarios más estudios para establecerlo.

La biogénesis mitocondrial requiere un ciclo continuo de eventos de fusión y fisión (Ventura-Clapier et al. 2008) para mantener una dinámica mitocondrial adecuada (Chen y Chan 2004). El reemplazo de E2 incrementa tanto los procesos de fusión como los de fisión, como indica el aumento de los niveles de las mitofusinas y de DRP1, son paralelos al perfil observado para los marcadores de biogénesis mitocondrial. Esto concuerda con la existencia de una conexión entre dinámica y biogénesis mitocondriales, que estaría modulada por el E2.

En los adipocitos, la función mitocondrial está ligada a la síntesis de adiponectina (Koh, et al. 2007; Wang, et al. 2013). El músculo esquelético también expresa adiponectina, y esta puede sufrir modificaciones postraduccionales dentro de la miofibra que permiten la generación de formas biológicamente activas que ejercen efectos metabólicos locales que son independientes de los niveles circulantes de adiponectina (Liu, et al. 2009a). Aunque el reemplazo de E2 *in vivo* restableció sólo parcialmente el descenso en los niveles de expresión de adiponectina inducido por la ovariectomía, los tratamientos con E2 y con Pg *in vitro* (aunque no la administración de T), estimularon claramente la expresión de adiponectina en los miotubos en cultivos, como ya había ocurrido con la biogénesis mitocondrial. Esto sugiere un papel relevante del E2 en la estimulación de la expresión de adiponectina en el músculo esquelético. Dicho papel estimulador del E2 en la expresión de adiponectina en el músculo esquelético no se refleja en los niveles circulantes de adiponectina, lo que no resulta sorprendente dado que el mayor

contribuyente a los niveles de adiponectina en suero es el TAB. De hecho, el perfil de adiponectina sérica es semejante al perfil que habíamos descrito previamente para la expresión de ARNm de adiponectina en el TAB retroperitoneal (Amengual-Cladera et al. 2012b). Estos resultados sugieren que la regulación de la adiponectina del músculo esquelético es independiente de los niveles circulantes de esta adipoquina.

AdipoR1 es el principal receptor de adiponectina en el músculo esquelético (Yamauchi, et al. 2003), y su acción está mediada por APPL1, que actúa como un regulador positivo de la señalización de la adiponectina en las células musculares (Deepa y Dong 2009). Nuestros resultados *in vitro* indican que el E2 estimula la expresión de adiponectina y de su receptor, mientras que el tratamiento con T tiene efectos opuestos y disminuye la expresión tanto de adiponectina como de elementos clave de su vía de señalización. Los efectos promovidos por el E2 *in vitro* concuerdan con los resultados obtenidos en el músculo gastrocnemius blanco, donde el descenso en los niveles de estrógenos provocado por la ovariectomía induce una disminución de la expresión de adiponectina y de su vía de señalización que se restablecen con la administración de E2. No obstante, el restablecimiento asociado al E2 de los niveles de ARNm de APPL1 en el músculo gastrocnemius blanco de las ratas OVX no se observa en los miotubos L6E9. Esta falta de respuesta a las hormonas sexuales podría atribuirse a la ausencia de estimulación de la vía de señalización de la adiponectina por la propia adipoquina.

Tal como se ha descrito previamente, el AdipoR1 media los efectos autocrinos de la adiponectina (Jortay, et al. 2012; Patel, et al. 2012). Nuestros resultados proponen un papel del E2 en la estimulación no solo de la producción muscular de adiponectina sino también de su acción local. Además, el incremento de la expresión de *Sirt1* mediado por el E2 también apoya la idea de que esta hormona podría jugar un papel central en la estimulación de la señalización de la adiponectina en el músculo esquelético, ya que *Sirt1* es un

efector corriente abajo de la vía de señalización de la adiponectina que promueve la activación de PGC1 α (Iwabu, et al. 2010), lo que induce una mejora de la función y biogénesis mitocondriales. Estos datos conducen a la idea de una conexión potencial entre la señalización de la adiponectina y la biogénesis mitocondrial en el músculo esquelético, de forma similar a como se ha descrito en el TAB (Koh et al. 2007; Wang et al. 2013; Amengual-Cladera et al. 2012a y c), que se ve reforzada por el paralelismo observado en este estudio entre los perfiles de la biogénesis mitocondrial y la expresión de adiponectina bajo estimulación con E2.

En conjunto, nuestros resultados demuestran que el E2 puede establecerse como un estimulador relevante del proceso de biogénesis mitocondrial en el músculo esquelético, ya que incrementa la proliferación y la dinámica, así como la capacidad oxidativa mitocondriales, mientras que el estrés oxidativo se ve reducido. Estos resultados apoyan el papel del E2 en el dimorfismo sexual en el músculo esquelético de rata que habíamos reportado previamente, por el cual las ratas hembra muestran mayor masa mitocondrial y capacidad oxidativa, así como una mejor respuesta antioxidante que sus homólogos masculinos (Colom et al. 2007; Gómez-Pérez et al. 2008; Gómez-Pérez et al. 2012). Además, se demuestra que las hormonas ováricas juegan un papel relevante en la síntesis de adiponectina en el músculo esquelético, y que el E2 podría ser un efector clave en la estimulación de la sensibilidad muscular a la adiponectina. Por otra parte, la T no parece jugar un papel relevante en la modulación de la biogénesis mitocondrial ni de la expresión de adiponectina en las condiciones estudiadas, aunque disminuye la sensibilidad a la adiponectina. Finalmente, el paralelismo observado entre la mejora inducida por el E2 de la función y de la biogénesis mitocondriales y de la estimulación de la expresión de adiponectina sugiere la existencia de una conexión entre función mitocondrial y expresión de adiponectina en el músculo esquelético

que estaría modulada por las hormonas sexuales, de forma similar a como ocurre en el TAB.

4.3. DIMORFISMO SEXUAL EN EL EFECTO DE LA ROSIGLITAZONA SOBRE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL Y LA SÍNTESIS DE ADIPONECTINA DEL TAB GONADAL DE RATA

Los resultados presentados y discutidos en este apartado se basan en los datos obtenidos a partir del análisis del TAB gonadal de los animales utilizados en el experimento ROSIGLITAZONA así como en datos derivados de adipocitos 3T3-L1 tratados con Rsg. El hilo conductor de este capítulo consiste en dilucidar si existe un dimorfismo sexual en los efectos de la Rsg sobre la función mitocondrial y la síntesis de adiponectina en el TAB gonadal.

4.3.1. Resultados

Efecto del sexo, la dieta y del tratamiento con Rsg sobre el peso corporal y del TAB gonadal, el índice de adiposidad y la ingesta energética

Ni el peso del TAB gonadal relativo al peso corporal ni el índice de adiposidad mostraron diferencias entre los machos y las hembras control (Tabla 14). La HFD aumentó tanto el peso corporal como el peso del depósito gonadal relativo al peso corporal en ambos sexos, aunque el índice de adiposidad se incrementó en respuesta a la HFD solo en los machos. La administración de Rsg restableció el peso corporal de machos y hembras a los valores control, y lo mismo con el peso relativo del TAB gonadal y con el índice de adiposidad de los machos pero no de las hembras. La ingesta energética fue la misma en ambos grupos control, pero las hembras HFD disminuyeron su ingesta energética en comparación con los machos HFD y con las hembras control. El tratamiento con Rsg aumentó las ingesta en los machos pero no en las hembras.

Test de tolerancia a la glucosa

Los resultados (Figura 17) muestran un aumento de los niveles de glucosa en sangre en todos los grupos experimentales con un pico de hiperglucemia a los 15 minutos tras la administración de glucosa. La normoglucemia se alcanzó en las hembras HFD a los 60 minutos, mientras que en los machos se presentó intolerancia a la glucosa. La Rsg mejoró la intolerancia en los machos.

Efecto del sexo, la dieta y del tratamiento con Rsg sobre los niveles circulantes de glucosa, TAG, NEFAs, adipoquinas y hormonas sexuales

Los niveles séricos de glucosa de las ratas control hembra eran menores que los de los machos, mientras que los niveles de TAG y NEFA no mostraron diferencias entre hembras y machos control (Tabla 15). La HFD incrementó los niveles de TAG tanto en las ratas macho (59%) como en las hembras (33%). La concentración de glucosa circulante aumentó por la HFD en las hembras pero no en los machos, mientras que los niveles de NEFA aumentaron en las ratas macho pero no en las hembras en respuesta a la HFD. La administración de Rsg restableció los niveles control de glucosa, TAG y NEFA en los machos. En las ratas hembra, la administración de Rsg disminuyó los niveles de glucosa y de TAG mientras que no se modificaron los de NEFA.

Las concentraciones séricas de resistina y de leptina fueron menores en las hembras control que en sus machos homólogos, pero no hubo diferencias en los niveles de adiponectina (Tabla 15). La dieta HFD incrementó los niveles de leptina tanto en machos como en hembras, aunque la concentración se mantuvo inferior en las hembras. Los niveles de adiponectina y de resistina aumentaron en respuesta a la HFD en las hembras pero no en los machos, aunque los valores de resistina se mantuvieron por debajo de los de los machos HFD. La administración de Rsg incrementó los niveles circulantes de

adiponectina en ambos sexos. En los machos, la concentración de resistina aumentó pero la de leptina disminuyó por efecto de la Rsg. Los niveles de E2 y de progesterona no se vieron alterados ni por el tratamiento dietético ni por el farmacológico (Tabla 15).

Efecto del sexo, la dieta y del tratamiento con Rsg sobre los marcadores de función, biogénesis y dinámica mitocondriales en el TAB gonadal

El contenido mitocondrial medido como los niveles de ADNmt aumentó con el tratamiento con Rsg (Tabla 16). De entre los marcadores de biogénesis mitocondrial analizados, los niveles de ARNm de *Pgc1b* y de *Tfam* mostraron el mismo perfil, aumentando con la administración de Rsg en ambos sexos, mientras que los niveles de ARNm de *Pgc1a* eran mayores en hembras que en machos y no se alteraron con la administración de Rsg (Tabla 16). Las actividades COX y CS también aumentaron en ambos sexos tras la administración de Rsg, pero el incremento fue mayor en las hembras que en los machos (Tabla 16). La expresión del marcador de fisión mitocondrial *Fis1* aumentó con el tratamiento con Rsg en los machos (Tabla 16). Por su parte, los niveles de ARNm de *Mfn1* disminuyeron con la Rsg en ambos sexos, mientras que la expresión de *Mfn2* aumentó con la Rsg solo en las hembras

Efecto del sexo y del tratamiento con Rsg sobre la expresión de adipoquinas en el TAB gonadal

Los niveles de ARNm de adiponectina aumentaron con el tratamiento con Rsg en ambos sexos, pero el incremento fue más pronunciado en las hembras que en los machos (Figura 18). Por otra parte, los niveles de ARNm de resistina fueron menores en las hembras que en los machos y no sufrieron alteraciones con el tratamiento con Rsg.

Efecto del tratamiento con Rsg sobre los marcadores de función, biogénesis y dinámica mitocondriales en los adipocitos blancos 3T3-L1

El tratamiento con Rsg de los adipocitos 3T3-L1 indujo un incremento del contenido mitocondrial medido mediante el ADNmt (Tabla 17) y la fluorescencia del MTG (Figura 19). La expresión de los principales marcadores del proceso de biogénesis mitocondrial analizados (*Pgc1a*, *Pgc1b* y *Tfam*) también aumentó con el tratamiento con Rsg (Tabla 18). La función mitocondrial medida a través de las actividades COX y CS, así como de los niveles de ARNm de *Cox4* y del potencial de membrana, también se incrementó en respuesta al tratamiento con Rsg en los adipocitos blancos (Tabla 17). Sin embargo, ni el contenido de cardiolipina (Tabla 17) ni la expresión de los marcadores de dinámica mitocondrial analizados (*Fis1*, *Mfn1* and *Mfn2*, Tabla 18) resultaron alterados por el tratamiento con Rsg.

Efecto del tratamiento con Rsg sobre los niveles de adipoquinas y de receptores de adiponectina en los adipocitos blancos 3T3-L1

Los niveles de ARNm de adiponectina y de resistina aumentaron en respuesta al tratamiento con Rsg, mientras que la expresión de los receptores de adiponectina no se vio afectada (Tabla 19).

Efecto del tratamiento con antimicina sobre los niveles de adipoquina y los marcadores de la biogénesis mitocondrial en los adipocitos blancos 3T3-L1

El tratamiento con antimicina, que bloquea la cadena respiratoria mitocondrial, disminuyó los niveles de ARNm y de proteína de la adiponectina, y también la expresión de resistina en los adipocitos blancos 3T3-L1. Por el contrario, la expresión de los receptores de adiponectina y de los principales marcadores de proliferación y de diferenciación analizados (*Pgc1a*, *Tfam*, *Cs* y *Cox4*) no se alteró en respuesta al tratamiento con antimicina (Tabla 20).

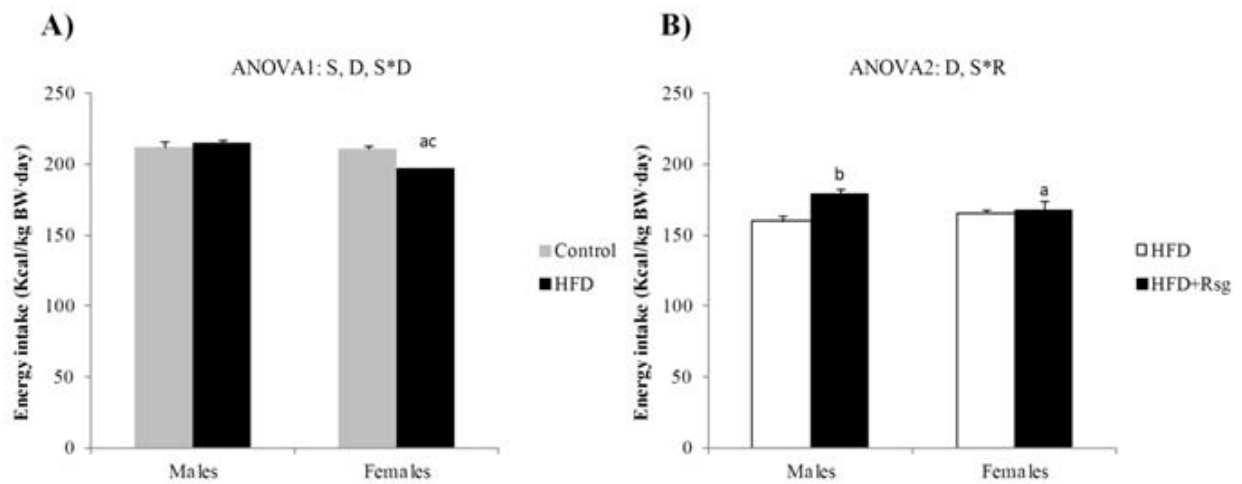


Figura 16.- Efecto de la dieta y del tratamiento con rosiglitazona sobre la ingesta energética. (A) Diferencias entre la ingesta calórica de los grupos control y HFD medida de la semana 1 a la 15 (B) Diferencias entre la ingesta calórica de los grupos HFD y HFD+Rsg medida de la semana 13 a la 15. HFD, dieta rica en lípidos y sacarosa; HFD+Rsg, HFD suplementada con rosiglitazona (100mg/Kg dieta). Los valores están expresados como la media \pm SEM de 7 u 8 animales por grupo. ANOVA 1($p<0.05$): S, efecto sexo; D, efecto dieta; S*D, efecto interactivo de sexo y dieta; NS, no hay efecto significativo. T-test ($p<0.05$): a, hembras vs machos; c, HFD vs Control. ANOVA 2($p<0.05$): S, efecto sexo; R, efecto rosiglitazona; S*R, efecto interactivo de sexo y rosiglitazona; NS, no hay efecto significativo. T-test ($p<0.05$): a, hembras vs machos; b, HFD+Rsg vs HFD.

Tabla 14.- Efecto de la dieta y del tratamiento con rosiglitazona sobre el peso corporal y del TAB gonadal, el índice de adiposidad y la ingesta energética

	Machos			Hembras			
	Control	HFD	HFD+Rsg	Control	HFD	HFD+Rsg	ANOVA 1 ANOVA 2
Peso corporal (g)							
	459 ± 4	483 ± 6c	476 ± 7	249 ± 2a	269 ± 10ac	259 ± 3a	S, D S
Peso del TAB gonadal (g/100g PC)							
	2.98 ± 0.80	3.98 ± 0.33c	2.88 ± 0.19b	3.20 ± 0.30	4.05 ± 0.33c	3.56 ± 0.18	D R
Índice de adiposidad (%)							
	8.10 ± 0.36	11.3 ± 0.4c	8.38 ± 0.41b	7.76 ± 0.41	8.56 ± 0.29a	9.03 ± 0.33	S, D, S*D S, R, S*R

HFD, dieta rica en lípidos y sacarosa; HFD+Rsg, HFD suplementada con rosiglitazona (100mg/Kg dieta); TAB, tejido adiposo blanco; PC, peso corporal. El índice de adiposidad es la suma de los depósitos de TAB gonadal, mesentérico y retroperitoneal relativo a 100g de PC. Los valores están expresados como la media±SEM de 7 u 8 animales por grupo. ANOVA 1 (p<0.05): S, efecto sexo; D, efecto dieta; S*D, efecto interactivo de sexo y dieta; NS, no hay efecto significativo. T-test (p<0.05): a, hembras vs machos; c, HFD vs Control. ANOVA 2 (p<0.05): S, efecto sexo; R, efecto rosiglitazona; S*R, efecto interactivo de sexo y rosiglitazona; NS, no hay efecto significativo. T-test (p<0.05): a, hembras vs machos; b, HFD+Rsg vs HFD.

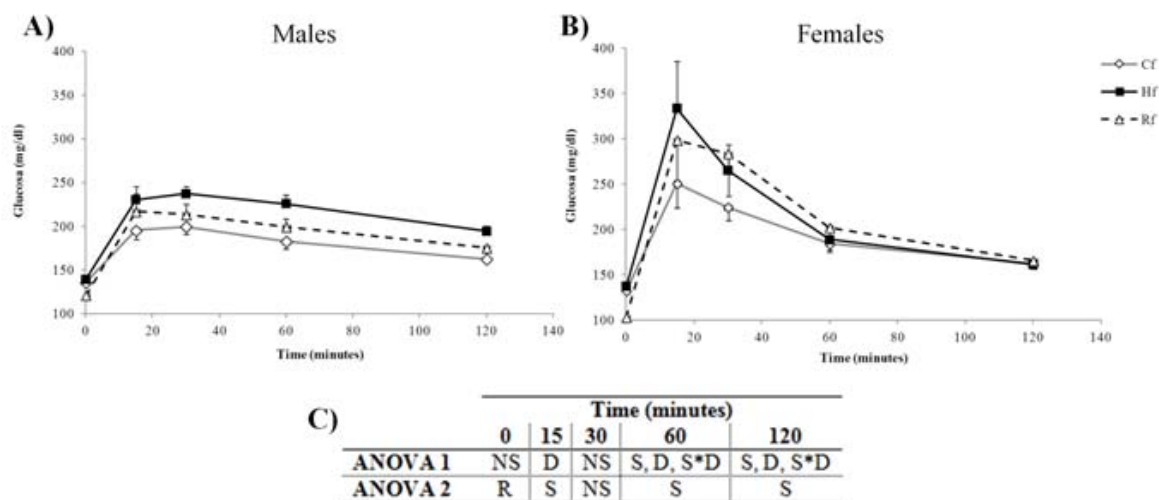


Figura 17.- Efecto de la dieta y del tratamiento con rosiglitazona sobre las curvas de tolerancia a la glucosa. HFD, dieta rica en lípidos y sacarosa; HFD+Rsg, dieta rica en lípidos y sacarosa tratados con rosiglitazona (100mg/Kg dieta). Los valores están expresados como la media \pm SEM de 7 u 8 animales por grupo. ANOVA 1($p<0.05$): S, efecto sexo; D, efecto dieta; S*D, efecto interactivo de sexo y dieta; NS, no hay efecto significativo. T-test ($p<0.05$): a, hembras vs machos; c, HFD vs Control. ANOVA 2($p<0.05$): S, efecto sexo; R, efecto rosiglitazona; S*R, efecto interactivo de sexo y rosiglitazona; NS, no hay efecto significativo. T-test ($p<0.05$): a, hembras vs machos; b, HFD+Rsg vs HFD.

Tabla 15.- Efecto de la dieta y del tratamiento con rosigitazona sobre los parámetros séricos

	Control	HFD	HFD+Rsg	Control	HFD	HFD+Rsg	ANOVA 1	ANOVA 2
Glucosa (mg/dL)	162 ± 3	156 ± 3	148 ± 2b	151 ± 2a	158 ± 2c	153 ± 4	S*D	R
Triglicéridos (mg/dL)	197 ± 15	314 ± 12c	163 ± 4b	172 ± 14	229 ± 17ac	164 ± 4b	S, D, S*D	S, R, S*R
NEFA (mg/dL)	15.7 ± 1.5	20.8 ± 0.4c	16.4 ± 0.3b	17.4 ± 0.6	17.1 ± 0.9a	16.9 ± 1.8	D, S*D	R, S*R
Adiponectina (µg/mL)	23.9 ± 1.4	21.3 ± 1.6	54.3 ± 3.0b	25.0 ± 1.7	36.6 ± 0.6ac	56.7 ± 4.3b	S, D, S*D	S, R, S*R
Resistina (ng/mL)	705 ± 31	679 ± 31	776 ± 10b	400 ± 15a	503 ± 46ac	509 ± 31a	S	S
Leptina (ng/mL)	9.24 ± 1.2	23.3 ± 3.2c	12.9 ± 2.1b	4.37 ± 0.89a	7.70 ± 1.04ac	6.29 ± 0.38a	S, D, S*D	S, R
E2 (%)	48.5 ± 4.6	46.6 ± 4.8	51.5 ± 3.5	100 ± 9a	90.2 ± 4.7a	90.8 ± 16.5a	S	S
Progesterona (ng/mL)	6.49 ± 0.99	6.71 ± 0.75	7.88 ± 1.03	46.3 ± 4.6a	55.0 ± 4.8a	45.5 ± 4.6a	S	S

HFD, dieta rica en lípidos y sacarosa; HFD+Rsg, HFD suplementada con rosigitazona (100mg/Kg dieta); NEFA, ácidos grasos libres; E2, 17beta-estradiol. Los valores están expresados como la media±SEM de 7 u 8 animales por grupo. ANOVA 1 (p<0.05): S, efecto sexo; D, efecto dieta; S*D, efecto interactivo de sexo y dieta; NS, no hay efecto significativo. T-test (p<0.05): a, hembras vs machos; c, HFD vs Control. ANOVA 2 (p<0.05): S, efecto sexo; R, efecto rosigitazona; S*R, efecto interactivo de sexo y rosigitazona; NS, no hay efecto significativo. T-test (p<0.05): a, hembras vs machos; b, HFD+Rsg vs HFD.

Tabla 16.- Efecto del tratamiento con rosiglitazona sobre los marcadores de función y biogénesis mitocondriales en el TAB gonadal

	Males		Females		ANOVA
	HFD	HFD+Rsg	HFD	HFD+Rsg	
Actividad CS (mUI/mg proteína)	10.2 ± 1.4	19.0 ± 3.3b	16.6 ± 3.7	38.7 ± 7.2ab	S, R
Actividad COX (UA/mg proteína)	100 ± 9	135 ± 12b	117 ± 18	274 ± 51ab	S*R
<i>Datos normalizados</i>					
ADNmt	1.34 ± 0.08	2.26 ± 0.16b	1.67 ± 0.24	2.66 ± 0.34b	R
<i>Pgc1a</i>	3.95 ± 0.38	3.11 ± 0.85	7.45 ± 1.70a	6.06 ± 1.16a	S
<i>Pgc1b</i>	1.89 ± 0.20	5.66 ± 0.86b	1.68 ± 0.35	5.28 ± 0.53b	R
<i>Tfam</i>	1.93 ± 0.37	3.42 ± 0.48b	2.43 ± 0.43	4.68 ± 0.92b	R
<i>Fis1</i>	2.14 ± 0.39	3.97 ± 0.45b	2.21 ± 0.48	2.60 ± 0.28a	R
<i>Mfn1</i>	8.48 ± 1.80	4.35 ± 0.65b	4.22 ± 0.72a	2.06 ± 0.33ab	S, R
<i>Mfn2</i>	2.32 ± 0.35	2.98 ± 0.59	1.79 ± 0.23	2.94 ± 0.33b	R

HFD, dieta rica en lípidos y sacarosa; HFD+Rsg, HFD suplementada con rosiglitazona (100mg/Kg dieta); CS, citrato sintasa; COX, citocromo c oxidasa; ADNmt, ADN mitocondrial, *Pgc1a* y *b*, coactivadores 1 alfa y beta del receptor activado por proliferadores peroxisomales gamma; *Tfam*, factor de transcripción nuclear A; *Fis1*, proteína de fisión 1; *Mfn1* y *2*, mitofusinas 1 y 2. Los valores están expresados como la media±SEM de 7 u 8 animales por grupo. ANOVA (p<0.05): S, efecto sexo; R, efecto rosiglitazona; S*R, efecto interactivo de sexo y rosiglitazona; NS, no hay efecto significativo. T-test (p<0.05): a, hembras vs machos; b, HFD+Rsg vs HFD.

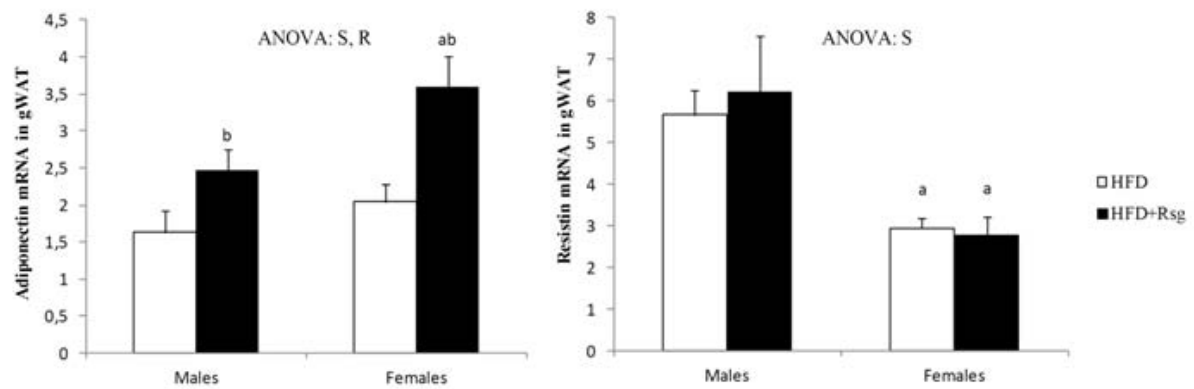


Figura 18.- Efecto del tratamiento con rosiglitazona sobre los niveles de expresión de adipoquinas en el TAB gonadal. gWAT, *gonadal white adipose tissue*, tejido adiposo blanco gonadal, HFD, dieta rica en lípidos y sacarosa; HFD+Rsg, dieta rica en lípidos y sacarosa suplementada con rosiglitazona (100mg/Kg dieta). Los valores están expresados como la media \pm SEM de 7 u 8 animales por grupo. Para el ARNm se utilizó el software Genex para analizar los valores de Ct normalizados respecto al 18S ANOVA ($p < 0.05$): S, efecto sexo; R, efecto rosiglitazona; S*R, efecto interactivo de sexo y rosiglitazona; NS, no hay efecto significativo. T-test ($p < 0.05$): a, hembras vs machos; b, HFD+Rsg vs HFD.

Tabla 17.- Efecto de la rosiglitazona sobre los indicadores de contenido y función mitocondrial en adipocitos blancos 3T3-L1

	Control	Rsg
ADNmt (%)	100 ± 26	255 ± 51*
Cardiolipina (%)	100 ± 2	111 ± 5
CS (UI/mg proteína)	0.218 ± 0.005	0.277 ± 0.026*
Ct ARNm (DN)	1.12 ± 0.08	2.46 ± 0.31*
Cox4 ARNm (DN)	1.17 ± 0.07	1.55 ± 0.13*
Potencial de membrana (%)	100 ± 2	123 ± 7*

Rsg, rosiglitazona; ADNmt, ADN mitocondrial; CS, citrato sintasa; Cox4, citocromo c oxidasa subunidad 4; DN, datos normalizados. La actividad CS está expresada en unidades internacionales ($\mu\text{mol}/\text{min}$). En los datos de ARNm, el software Genex se usó para normalizar los valores de Ct a los de 18S. Los valores están expresados como la media \pm SEM de 3 experimentos realizados por duplicado (n=6). T-test ($p<0.05$): *, diferencia significativa respecto a las células control

Tabla 18.- Efecto de la rosiglitazona sobre los niveles de ARNm de los marcadores de biogénesis y dinámica mitocondriales en adipocitos blancos 3T3-L1

	Control	Rsg
<i>Pgc1a</i>	1.66 ± 0.08	2.19 ± 0.13*
<i>Pgc1b</i>	1.83 ± 0.23	3.02 ± 0.58*
<i>Tfam</i>	1.26 ± 0.05	1.94 ± 0.13*
<i>Fis1</i>	1.11 ± 0.03	1.26 ± 0.12
<i>Mfn1</i>	1.34 ± 0.04	1.56 ± 0.20
<i>Mfn2</i>	1.23 ± 0.07	1.91 ± 0.48*

Rsg, rosiglitazona; Pgc1a y b, coactivadores 1 alfa y beta del receptor activado por proliferadores peroxisomales gamma; Tfam, factor de transcripción nuclear A; Fis1, proteína de fisión 1; Mfn1 y 2, mitofusinas 1 y 2. El software Genex se usó para normalizar los valores de Ct a los de 18S. Los valores están expresados como la media \pm SEM de 3 experimentos realizados por duplicado (n=6). T-test ($p<0.05$): *, diferencia significativa respecto a las células control

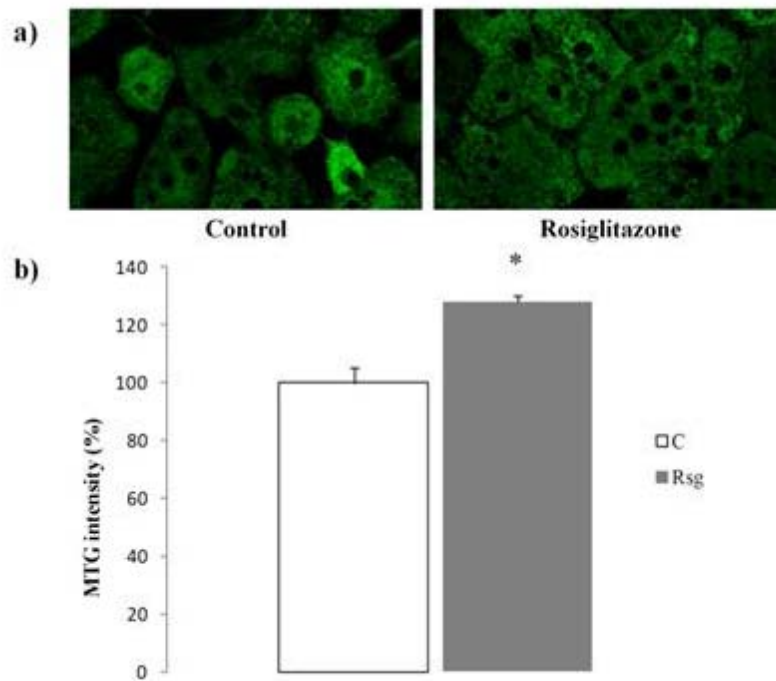


Figura 19.- Efecto de la rosiglitazona sobre la masa mitocondrial en los adipocitos blancos 3T3-L1. a) Imágenes de microscopía confocal de células 3T3-L1 teñidas con MTG 0.5 μ M. b) Intensidad de la fluorescencia. Los valores están expresados como la media \pm SEM de 9 regiones de un campo de visión con los valores para las células control establecidos como 100. La fluorescencia se monitorizó con un Microscopio Confocal Leica usando las lentes 40X, y se cuantificó mediante el programa ImageJ. T-test ($p < 0.05$): *, diferencia significativa vs las células control. Rsg, rosiglitazona; MTG, Mitotracker Green.

Tabla 19.- Efecto de la rosiglitazona sobre los niveles de ARNm de adipoquinas y receptores de adiponectina en adipocitos blancos 3T3-L1

	Control	Rsg
Adiponectina	1.42 ± 0.05	1.85 ± 0.22*
<i>AdipoR1</i>	1.27 ± 0.03	1.44 ± 0.11
<i>AdipoR2</i>	1.21 ± 0.05	1.38 ± 0.10
<i>AdipoR1/AdipoR2</i>	1.05 ± 0.03	1.06 ± 0.09
Resistina	2.29 ± 0.21	3.94 ± 0.41*

Rsg, rosiglitazona; AdipoR1 y 2, receptores de adiponectina 1 y 2. El software Genex se usó para normalizar los valores de Ct a los de 18S. Los valores están expresados como la media±SEM de 3 experimentos realizados por duplicado (n=6). T-test (p<0.05): *, diferencia significativa respecto a las células control

Tabla 20.- Efecto de la antimicina sobre los niveles de adipoquinas, receptores de adiponectina y marcadores de función y biogénesis mitocondriales en adipocitos blancos 3T3-L1

	Control	Antimicina
Adiponectina (%)	100 ± 10	25.1 ± 7.6* ^s
<i>Datos normalizados</i>		
Adiponectina	4.59 ± 0.76	1.28 ± 0.08*
<i>AdipoR1</i>	1.44 ± 0.18	2.05 ± 0.07
<i>AdipoR2</i>	1.99 ± 0.23	1.83 ± 0.08
<i>AdipoR1/AdipoR2</i>	0.60 ± 0.08	1.16 ± 0.04*
Resistin	4.92 ± 0.99	2.59 ± 1.22*
<i>Pgc1a</i>	3.01 ± 0.32	3.33 ± 0.33
<i>Tfam</i>	5.80 ± 1.21	6.59 ± 0.33
<i>Cox4</i>	1.91 ± 0.13	2.01 ± 0.06
<i>Cs</i>	1.89 ± 0.31	2.16 ± 0.29

AdipoR1 y 2, receptores de adiponectina 1 y 2; Pgc1a, coactivador 1 alfa del receptor activado por proliferadores peroxisomales gamma; Tfam, factor de transcripción nuclear A; Cox4, citocromo c oxidasa subunidad 4; Cs, citrato sintasa. El software Genex se usó para normalizar los valores de Ct a los de 18S. Los valores están expresados como la media±SEM de 3 experimentos realizados por duplicado (n=6). T-test (p<0.05): *, diferencia significativa respecto a las células control

4.3.2. Discusión

Estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación han puesto de manifiesto que el TAB gonadal de las ratas hembra presenta mitocondrias más diferenciadas y funcionales que el de los machos, lo que resulta en una mayor expresión de adiponectina y, en consecuencia, en un mejor perfil de sensibilidad a la insulina. Además, la alimentación con una dieta hiperlipídica induce disfunción mitocondrial en el TAB gonadal y alteraciones en la sensibilidad a la insulina de diferente modo en función del sexo, de forma que las ratas hembra presentan menores alteraciones de la función mitocondrial que sus homólogos machos, lo que resulta en un perfil de sensibilidad a la insulina menos alterado en las hembras en respuesta a una dieta obesogénica (Amengual-Cladera, et al. 2012a; Amengual-Cladera, et al. 2012).

Los animales utilizados en el presente estudio parten de un peso corporal mayor que los animales control, así como de una situación metabólica alterada debido a la ingesta de la HFD que se refleja en el aumento significativo de los niveles plasmáticos de TAG. Sin embargo, únicamente las ratas macho muestran alteraciones en la tolerancia a la glucosa. Siendo así, el objetivo de esta investigación es analizar si la respuesta al tratamiento con Rsg (un agonista del PPAR γ que aumenta el contenido mitocondrial en los adipocitos y los niveles plasmáticos de adiponectina) se modula de forma diferente entre machos y hembras.

La biogénesis mitocondrial promueve el mantenimiento de una función mitocondrial óptima (Lee y Wei 2005), y nuestro estudio muestra que la Rsg estimula dicha biogénesis tanto en el depósito periovárico como en el epididimal. Nuestros resultados muestran un aumento de la proliferación mitocondrial inducido por la Rsg (indicado por el incremento del ADNmt) que estaría mediado por la estimulación de la expresión del *Pgc1b*, un factor que regula la expresión génica mitocondrial en los adipocitos blancos (Pardo, et al. 2011), y por el consecuente aumento en la expresión de *Tfam*. En esta

misma línea, el aumento de *Pgc1b* en respuesta al tratamiento con Rsg, aumentaría también la diferenciación mitocondrial en el depósito gonadal, como muestra el incremento de las actividades COX y CS en los animales HFD+Rsg. Sin embargo, la magnitud de este incremento es mayor en el depósito periovárico que en el epididimal, indicando que la función mitocondrial está más fuertemente estimulada por la Rsg en el TAB gonadal de las ratas hembra que en el de los machos.

Junto con la biogénesis mitocondrial, la dinámica mitocondrial (procesos de fisión y de fusión) es crucial para mantener una correcta función mitocondrial, e incluso defectos leves en la dinámica mitocondrial se asocian al desarrollo de patologías como neuropatías, la progresión del hígado graso no alcohólico y la diabetes tipo 2 (Galloway y Yoon 2012; Liesa, et al. 2009; Zorzano, et al. 2009). En el estudio que nos ocupa, la Rsg promueve la fisión sobre la fusión en las mitocondrias del TAB gonadal de las ratas macho (aumento de la expresión de *Fis* y disminución de la de *Mfn1*), probablemente en un intento de contrarrestar la disfunción mitocondrial inducida por la HFD, ya que la fisión ayuda a aislar las mitocondrias dañadas promoviendo su autofagia (Twig, et al. 2008). En las hembras, el aumento en la expresión de *Mfn2* inducido por la administración de Rsg permite el mantenimiento de la fusión mitocondrial. Dicho aumento podría estar mediado por PGC1b, ya que este factor estimula la fusión mitocondrial a través del control preferencial de la expresión de *Mfn2* en comparación con el resto de componentes de la maquinaria de la dinámica mitocondrial (Liesa, et al. 2008). Además, la MFN2 ejerce acciones directas sobre el metabolismo mitocondrial que son independientes de su papel en la fusión mitocondrial (Sebastian, et al. 2012), por lo que su incremento podría estar relacionado con la mejora de la función mitocondrial y de la diferenciación en el depósito periovárico que hemos descrito anteriormente.

Los datos obtenidos *in vitro* apoyan nuestros resultados *in vivo*, ya que el tratamiento de adipocitos blancos 3T3-L1 con Rsg induce también un aumento de la función y biogénesis mitocondriales. Esto queda patente en el aumento de la expresión de *Pgc1a*, *Pgc1b*, y *Tfam* que resulta en una mayor proliferación (mostrada en el aumento de la masa mitocondrial medida por ADNmt y por la fluorescencia del MTG) y diferenciación de las mitocondrias, indicada por la estimulación de la actividad CS y por el aumento en la expresión de *Ct* y de *Cox4* así como por el aumento del potencial de membrana (un indicador de la actividad de la cadena de transporte de electrones (Rottenberg y Wu 1998) en las células tratadas con Rsg.

La estimulación de la función y biogénesis mitocondriales inducida por la Rsg en el TAB gonadal transcurre paralela al aumento de la expresión de adiponectina que de nuevo es mayor en las ratas hembra. Estos resultados están refrendados por los obtenidos *in vitro*, ya que las células tratadas con Rsg también muestran un incremento en la expresión de adiponectina. Cabe destacar que las células tratadas con antimicina, un inhibidor de la cadena respiratoria mitocondrial, no muestran variación en la expresión de los principales marcadores de función mitocondrial, mientras que la expresión de ambas adipoquinas analizadas (adiponectina y resistina) decrece. Estos resultados subrayan el hecho de que la expresión de adiponectina está íntimamente ligada a la función mitocondrial de los adipocitos, como ya se ha propuesto en otros estudios (Koh, et al. 2007; Wang, et al. 2013), y enfatizan la elevada sensibilidad de la síntesis y la secreción de adipoquinas a los fallos en la generación de energía y, en definitiva, a la disfunción mitocondrial. Además, estos resultados indican que la relación entre la función mitocondrial y la síntesis de adiponectina en el TAB se mantiene incluso bajo tratamiento farmacológico con Rsg.

Es relevante que, a pesar de las diferencias observadas en la expresión de adiponectina del TAB gonadal, los niveles de adiponectina circulante

aumenten en la misma medida en ambos sexos en respuesta al tratamiento con Rsg, lo que podría explicarse por la liberación compensatoria de adiponectina por parte de otros depósitos de TAB (Amengual-Cladera, et al. 2012c; Romero, et al. 2009). Mientras, la resistina, una adipoquina ligada a la resistencia a la insulina (Steppan, et al. 2001), exhibe un dimorfismo sexual en su expresión en el TAB gonadal, de modo que los machos presentan más ARNm de resistina que las hembras. Aunque hay un aumento en la expresión de resistina en las células 3T3-L1 tratadas con Rsg, no se observan cambios en la expresión de resistina en respuesta al tratamiento con Rsg *in vivo*. De hecho, el papel de la Rsg en la expresión de resistina es controvertido, ya que sus efectos *in vitro* son dependientes de dosis y de tiempo (Hartman, et al. 2002; Patel, et al. 2003), y los resultados *in vivo* varían en función de la dieta (Fraulob, et al. 2012; Steppan et al. 2001; Way, et al. 2001).

En resumen, la Rsg muestra efectos estimuladores de la función mitocondrial en el TAB gonadal de machos y hembras, promoviendo la biogénesis mitocondrial, y también la síntesis de adiponectina. Sin embargo, estos incrementos son más fuertes en el depósito periovárico, lo que sugiere que las ratas hembra son más sensibles que los machos a los efectos de la Rsg sobre la función mitocondrial y la síntesis de adiponectina del TAB gonadal. Esta mayor sensibilidad de las hembras a los efectos de la Rsg podría relacionarse con los diferentes efectos secundarios y farmacológicos de las TZD que se han descrito en hombres y mujeres (Tajiri, et al. 2007).



Recapitulación

El objetivo principal de la presente tesis doctoral ha sido la ***caracterización de los efectos de las hormonas sexuales sobre la función mitocondrial y la expresión de adiponectina en el eje adipo-muscular de la rata***, un objetivo fundamentado en el dimorfismo sexual previamente descrito en la función mitocondrial del TAB y del músculo esquelético, así como en el papel específico que juega el E2 en dicho dimorfismo y en la conexión entre la función mitocondrial y la síntesis de adiponectina en el TAB.

La principal razón para estudiar estos dos tejidos reside en que, a pesar de tener funciones metabólicas claramente diferenciadas, existe una estrecha relación entre ellos. Ambos tejidos presentan dianas similares para la insulina, lo que les hace especialmente vulnerables a los estímulos insulinoresistentes. Así mismo, se han revelado como importantes órganos endocrinos que sintetizan adipoquinas y mioquinas respectivamente, las cuales ejercen efectos autocrinos, paracrinos y endocrinos (Henry, et al. 2012; Pratesi, et al. 2013). La adiponectina, una adipoquina con acción sensibilizante a la insulina, es candidata a ser un elemento esencial de comunicación entre el TAB y el músculo esquelético, en lo que podríamos denominar el eje adipo-muscular que parece ser relevante en la regulación del metabolismo energético corporal.

Estudios previos de nuestro grupo de investigación han puesto de manifiesto que distintos depósitos de TAB y el músculo esquelético de las ratas hembra presentan mitocondrias más diferenciadas y funcionales que los de los machos (Amengual-Cladera et al. 2012a; Amengual-Cladera et al. 2012c; Colom et al. 2007a; Gómez-Pérez et al. 2012). Además, las hembras muestran una mayor expresión de adiponectina en el TAB, lo que se traduce en un mejor perfil de sensibilidad a la insulina, incluso bajo estímulos dietéticos obesogénicos inductores de disfunción mitocondrial y resistencia a la insulina (Amengual-Cladera et al. 2012a; Amengual-Cladera et al. 2012c). Los estrógenos se consideran uno de los principales elementos responsables de la estimulación

de la función mitocondrial y de la síntesis de adiponectina en el TAB, aunque no parecen ser el único factor implicado en el dimorfismo sexual observado en estos procesos (Amengual-Cladera et al. 2012b; Nadal-Casellas et al. 2011b). En el presente estudio nos planteamos profundizar en el papel que juegan las hormonas sexuales, especialmente el E2, en la función mitocondrial (oxidación, fosforilación, biogénesis y dinámica) y en la síntesis de adiponectina del TAB y del músculo esquelético, utilizando para ello ratas ovariectomizadas y suplementadas con E2, así como adipocitos 3T3-L1 y miotubos L6E9 tratados con diferentes hormonas sexuales.

Los resultados obtenidos en el estudio del TAB de las ratas ovariectomizadas, aunque previos al desarrollo de la presente tesis doctoral, han puesto de manifiesto una disminución de la expresión de adiponectina a nivel del depósito periovárico, reflejada en los niveles circulantes de esta adipoquina, que a su vez se acompaña de una disminución de la función mitocondrial en este tejido (Amengual-Cladera, Tesis doctoral, 2013). Por su parte, los resultados correspondientes al estudio del músculo esquelético en los animales ovariectomizados muestran que este tejido presenta un perfil similar al del TAB, es decir, una disminución de los marcadores de la función mitocondrial y de la expresión de adiponectina muscular que se recuperan en gran parte con la suplementación con E2. Es importante resaltar que, aunque la adiponectina procedente del TAB tiene importantes efectos a nivel sistémico, se desconoce todavía la relevancia de la adiponectina de procedencia muscular que, posiblemente, sólo tenga efectos autocrinos (Liu et al. 2009). Este efecto estimulador del E2 sobre la función mitocondrial y la expresión de adiponectina se confirma en los experimentos realizados tanto en adipocitos 3T3-L1 como en miotubos L6E9. Es destacable además que en el músculo esquelético el E2 no sólo estimule la expresión de la adiponectina, sino que también aumente la sensibilidad del tejido a esta adipoquina, tal como refleja

el aumento de los principales marcadores de su vía de señalización. Estos resultados ponen de manifiesto el importante papel estimulador del E2 sobre la función mitocondrial y la síntesis de adiponectina, lo que concuerda con el dimorfismo sexual descrito en estos procesos en distintos tejidos de rata (Amengual-Cladera et al. 2012a, 2012b; Amengual-Cladera et al. 2012c; Català-Niell et al. 2008; Colom et al. 2007a; Colom et al. 2007b; Gómez-Pérez et al. 2012; Gómez-Pérez et al. 2011a; Justo et al. 2005a; Justo et al. 2005b; Nadal-Casellas et al. 2010; Nadal-Casellas et al. 2011a; Nadal-Casellas et al. 2012; Rodríguez-Cuenca et al. 2002; Valle et al. 2007a; Valle et al. 2007b). En este sentido, cabe destacar que el tratamiento de ambos tipos celulares con T da resultados opuestos a los descritos para el E2, especialmente en los adipocitos, poniendo de manifiesto el efecto negativo de esta hormona sobre ambos procesos lo que coincide, una vez más, con las diferencias observadas entre machos y hembras. El E2 parece ejercer también un efecto reequilibrador que contrarrestaría estímulos negativos para la función mitocondrial y la síntesis de adiponectina en los adipocitos blancos, tal como se demuestra con la administración conjunta de E2 y T. Así, el E2 reequilibra la función mitocondrial alterada por la T y revierte la caída de los niveles de adiponectina y de sus receptores a la situación control. Estos resultados refuerzan los previos obtenidos en un modelo de disfunción mitocondrial inducida por la alimentación con una dieta obesogénica, en el que la función mitocondrial del TAB estaba alterada en los machos pero no en las hembras, cuyo entorno hormonal parece protegerlas de los efectos negativos de la dieta (Amengual-Cladera et al. 2012c). De este modo, los efectos del E2 serían más relevantes en situaciones que impliquen disfunción mitocondrial.

Los perfiles paralelos en los cambios de la función mitocondrial y de la expresión de adiponectina promovidos por las hormonas sexuales tanto *in vivo* como *in vitro*, refuerzan la idea de la existencia de una conexión entre ambos

procesos en el TAB y también en el músculo esquelético, resultado este último que constituye una de las contribuciones más relevantes de la presente tesis doctoral. Además, los resultados obtenidos ponen de manifiesto que la conexión entre función mitocondrial y expresión de adiponectina estaría modulada por las hormonas sexuales, tanto en el TAB como en el músculo esquelético.

Para avanzar en el conocimiento de los mecanismos que modulan este dimorfismo sexual, se ha planteado la utilización de un fármaco hipoglucemiante, la rosiglitazona, un agonista del PPAR γ que incrementa la sensibilidad a la insulina, mediante la mejora de la función mitocondrial y el incremento de los niveles plasmáticos de adiponectina (Scherer 2006; Wilson-Fritch, et al. 2004). Se pretendía evaluar si la respuesta estimuladora de la rosiglitazona sobre la función mitocondrial y la síntesis de adiponectina en el depósito gonadal del TAB se modula de forma diferente entre ratas macho y hembra resistentes a la acción de la insulina, alteración inducida mediante un tratamiento con una dieta hiperlipídica rica en sacarosa.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que la rosiglitazona estimula la función mitocondrial tanto en el TAB gonadal como en adipocitos 3T3-L1, aunque esta estimulación es mayor en el tejido periovárico que en el epididimal. Paralelamente, la rosiglitazona induce un aumento de la expresión de adiponectina en el TAB que es también mayor en las hembras que en los machos. Estos resultados refuerzan la idea de que la función mitocondrial sería uno de los factores que pueden condicionar la expresión de la adiponectina, e indican que dicha relación se mantiene en presencia de fármacos como la rosiglitazona, que mejoran la sensibilidad a la insulina aumentando la síntesis de adiponectina.

La mayor sensibilidad del TAB gonadal de las hembras a los efectos de la rosiglitazona es otra de las contribuciones relevantes de la presente tesis doctoral, resultados que, si fueran extrapolables a humanos, podrían estar relacionados con las diferencias en los efectos farmacológicos y secundarios de las TZDs en hombres y mujeres (Tajiri, et al. 2007).

En conjunto, los resultados ponen de manifiesto que la respuesta de la función mitocondrial a las hormonas sexuales es muy similar en el TAB y en el músculo esquelético. Paralelamente, la síntesis de adiponectina en el TAB y la vía de señalización de esta adipoquina en el músculo esquelético, responden de manera similar al efecto de las hormonas sexuales, reforzando así la hipótesis basada en la existencia de un eje adipo-muscular conectado a través de la adiponectina y regulado, al menos en parte, por las hormonas sexuales. Dada la implicación de esta adipoquina en el desarrollo de la resistencia a la insulina y el dimorfismo sexual observado, nuestros resultados constituirían un elemento más a tener en cuenta a la hora de explicar las diferencias entre sexos observadas en la predisposición al desarrollo de la resistencia a la insulina que subyace al síndrome metabólico.

Parte de los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral han sido recogidos en las siguientes publicaciones científicas:

- Capllonch-Amer G; Lladó I, Proenza AM, García-Palmer FJ, Gianotti M. **Opposite effects of 17-beta estradiol and testosterone on mitochondrial biogenesis and adiponectin synthesis in white adipocytes** Journal of Molecular Endocrinology (2014) 52, 203–214. DOI: 10.1530/JME-13-0201
- Capllonch-Amer G, Sbert-Roig M, Galmés-Pascual BM, Proenza AM, Lladó I, Gianotti M, García-Palmer FJ **Estradiol stimulates mitochondrial biogenesis and adiponectin synthesis in skeletal muscle** Journal of Endocrinology. En prensa DOI: 10.1530/JOE-14-0008



Conclusiones

Las principales conclusiones derivadas de esta tesis doctoral son las siguientes:

- I. El estradiol estimula la función mitocondrial y la expresión de adiponectina en adipocitos 3T3-L1, mientras que la testosterona presenta efectos contrarios en ambos procesos. Este paralelismo sugiere la existencia de una conexión entre la función mitocondrial y la síntesis de adiponectina en el tejido adiposo blanco, que estaría modulada por las hormonas sexuales.
- II. El estradiol contrarresta estímulos negativos para la función mitocondrial y la síntesis de adiponectina en los adipocitos. Así, esta hormona normaliza la función mitocondrial alterada por la testosterona y revierte la caída de los niveles de adiponectina y de sus receptores a la situación control.
- III. En el músculo esquelético, el estradiol también estimula la función mitocondrial, aumentando la biogénesis, la dinámica y la capacidad oxidativa mitocondriales y reduciendo el estrés oxidativo. Paralelamente, aumenta la expresión de adiponectina y la sensibilidad del tejido a esta adipoquina, ya que estimula su vía de señalización.
- IV. En miotubos L6E9, el estradiol estimula la biogénesis mitocondrial, así como la expresión de adiponectina y la sensibilidad de estas células a esta adipoquina. A diferencia de lo que ocurre en los adipocitos, el efecto de la testosterona no es tan negativo, ya que disminuye únicamente la sensibilidad de los miotubos a la adiponectina.

- V. En el músculo esquelético, la función mitocondrial y la síntesis de adiponectina estarían vinculadas de forma similar a como ocurre en el tejido adiposo blanco, ya que a pesar de las diferencias funcionales entre ambos tejidos, en el músculo se ha observado también un paralelismo entre estos procesos que estaría también modulado por las hormonas sexuales.
- VI. Los resultados sugieren la existencia de un eje adipo-muscular conectado a través de la adiponectina y regulado, al menos en parte, por las hormonas sexuales.
- VII. Existe un dimorfismo sexual en la respuesta a la rosiglitazona en ratas con intolerancia a la glucosa, de modo que el tejido adiposo blanco gonadal de las hembras es más sensible que el de los machos a los efectos estimuladores del fármaco sobre la función mitocondrial y la síntesis de adiponectina.
- VIII. Dada la relación inversa entre los niveles de adiponectina y el desarrollo de la resistencia a la insulina y teniendo en cuenta el dimorfismo sexual en la función mitocondrial y en la síntesis de adiponectina, nuestros resultados constituirían un elemento más a tener en cuenta a la hora de explicar el dimorfismo sexual que presentan los humanos en la predisposición al desarrollo de la resistencia a la insulina que subyace al síndrome metabólico.



Referencias bibliográficas

- Abdul-Ghani MA & DeFronzo RA 2010 Pathogenesis of insulin resistance in skeletal muscle. *J Biomed Biotechnol* **2010** 476279.
- Abu-Elheiga L, Oh W, Kordari P & Wakil SJ 2003 Acetyl-CoA carboxylase 2 mutant mice are protected against obesity and diabetes induced by high-fat/high-carbohydrate diets. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100** 10207-10212.
- Afanas'ev IB 2007 Signaling functions of free radicals superoxide & nitric oxide under physiological & pathological conditions. *Mol Biotechnol* **37** 2-4.
- Ahima RS 2006 Adipose tissue as an endocrine organ. *Obesity (Silver Spring)* **14 Suppl 5** 242S-249S.
- Alam TI, Kanki T, Muta T, Ukaji K, Abe Y, Nakayama H, Takio K, Hamasaki N & Kang D 2003 Human mitochondrial DNA is packaged with TFAM. *Nucleic Acids Res* **31** 1640-1645.
- Alexeyev MF, Ledoux SP & Wilson GL 2004 Mitochondrial DNA and aging. *Clin Sci (Lond)* **107** 355-364.
- Aloni Y & Attardi G 1971 Symmetrical in vivo transcription of mitochondrial DNA in HeLa cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **68** 1757-1761.
- Amengual-Cladera E 2013 dimorfismo sexual en la función y biogénesis mitocondriales en el tejido adiposo blanco de rata. Respuesta a una dieta hiperlipídica. *Tesis doctoral*
- Amengual-Cladera E, Llado I, Gianotti M & Proenza AM 2012a Sex differences in the effect of high-fat diet feeding on rat white adipose tissue mitochondrial function and insulin sensitivity. *Metabolism* **61** 1108-1117.
- Amengual-Cladera E, Llado I, Gianotti M & Proenza AM 2012b Retroperitoneal white adipose tissue mitochondrial function and adiponectin expression in response to ovariectomy and 17beta-estradiol replacement. *Steroids* **77** 659-665.
- Amengual-Cladera E, Lladó I, Proenza AM & Gianotti M 2012c High-fat diet feeding induces a depot-dependent response on the pro-inflammatory state and mitochondrial function of gonadal white adipose tissue. *Br J Nutr* **109** 413-424.
- Amin RH, Mathews ST, Camp HS, Ding L & Leff T 2010 Selective activation of PPARgamma in skeletal muscle induces endogenous production of adiponectin and protects mice from diet-induced insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **298** E28-37.
- Anderson EJ, Lustig ME, Boyle KE, Woodlief TL, Kane DA, Lin CT, Price JW, 3rd, Kang L, Rabinovitch PS, Szeto HH, et al. 2009 Mitochondrial H₂O₂ emission and cellular redox state link excess fat intake to insulin resistance in both rodents and humans. *J Clin Invest* **119** 573-581.
- Anderson EJ & Neuffer PD 2006 Type II skeletal myofibers possess unique properties that potentiate mitochondrial H₂O₂ generation. *Am J Physiol Cell Physiol* **290** C844-851.

Arany Z, He H, Lin J, Hoyer K, Handschin C, Toka O, Ahmad F, Matsui T, Chin S, Wu PH, et al. 2005 Transcriptional coactivator PGC-1 alpha controls the energy state and contractile function of cardiac muscle. *Cell Metab* **1** 259-271.

Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, et al. 1999 Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* **257** 79-83.

Aso Y, Yamamoto R, Suetsugu M, Matsumoto S, Wakabayashi S, Matsutomo R, Takebayashi K & Inukai T 2007 Comparison of the effects of pioglitazone and voglibose on circulating total and high-molecular-weight adiponectin, and on two fibrinolysis inhibitors, in patients with Type 2 diabetes. *Diabet Med* **24** 962-968.

Attardi G & Schatz G 1988 Biogenesis of mitochondria. *Annu Rev Cell Biol* **4** 289-333.

Ayres S, Tang M & Subbiah MT 1996 Estradiol-17beta as an antioxidant: some distinct features when compared with common fat-soluble antioxidants. *J Lab Clin Med* **128** 367-375.

Bach D, Pich S, Soriano FX, Vega N, Baumgartner B, Oriola J, Daugaard JR, Lloberas J, Camps M, Zierath JR, et al. 2003 Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism. A novel regulatory mechanism altered in obesity. *J Biol Chem* **278** 17190-17197.

Bardin CW, Brown T, Isomaa VV & Janne OA 1983 Progestins can mimic, inhibit and potentiate the actions of androgens. *Pharmacol Ther* **23** 443-459.

Beckett T, Tchernof A & Toth MJ 2002 Effect of ovariectomy and estradiol replacement on skeletal muscle enzyme activity in female rats. *Metabolism* **51** 1397-1401.

Belfort R, Harrison SA, Brown K, Darland C, Finch J, Hardies J, Balas B, Gastaldelli A, Tio F, Pulcini J, et al. 2006 A placebo-controlled trial of pioglitazone in subjects with nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med* **355** 2297-2307.

Bereiter-Hahn J & Voth M 1994 Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microsc Res Tech* **27** 198-219.

Berg AH, Combs TP & Scherer PE 2002 ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism. *Trends Endocrinol Metab* **13** 84-89.

Beyer TA, Xu W, Teupser D, auf dem Keller U, Bugnon P, Hildt E, Thiery J, Kan YW & Werner S 2008 Impaired liver regeneration in Nrf2 knockout mice: role of ROS-mediated insulin/IGF-1 resistance. *EMBO J* **27** 212-223.

Bjorntorp P 1991 Metabolic implications of body fat distribution. *Diabetes Care* **14** 1132-1143.

Bjorntorp P 1997 Hormonal control of regional fat distribution. *Hum Reprod* **12 Suppl 1** 21-25.

- Boden G, Homko C, Mozzoli M, Showe LC, Nichols C & Cheung P 2005 Thiazolidinediones upregulate fatty acid uptake and oxidation in adipose tissue of diabetic patients. *Diabetes* **54** 880-885.
- Bogacka I, Xie H, Bray GA & Smith SR 2005 Pioglitazone induces mitochondrial biogenesis in human subcutaneous adipose tissue in vivo. *Diabetes* **54** 1392-1399.
- Bogenhagen D & Clayton DA 1977 Mouse L cell mitochondrial DNA molecules are selected randomly for replication throughout the cell cycle. *Cell* **11** 719-727.
- Borrás C, Gambini J, Gomez-Cabrera MC, Sastre J, Pallardo FV, Mann GE & Vina J 2005 17beta-oestradiol up-regulates longevity-related, antioxidant enzyme expression via the ERK1 and ERK2[MAPK]/NFkappaB cascade. *Aging Cell* **4** 113-118.
- Borrás C, Sastre J, Garcia-Sala D, Lloret A, Pallardo FV & Vina J 2003 Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males. *Free Radic Biol Med* **34** 546-552.
- Braissant O, Foufelle F, Scotto C, Dauca M & Wahli W 1996 Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology* **137** 354-366.
- Brand MD & Nicholls DG 2011 Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem J* **435** 297-312.
- Brand MD, Pamplona R, Portero-Otin M, Requena JR, Roebuck SJ, Buckingham JA, Clapham JC & Cadenas S 2002 Oxidative damage and phospholipid fatty acyl composition in skeletal muscle mitochondria from mice underexpressing or overexpressing uncoupling protein 3. *Biochem J* **368** 597-603.
- Brochu-Gaudreau K, Rehfeldt C, Blouin R, Bordignon V, Murphy BD & Palin MF 2010 Adiponectin action from head to toe. *Endocrine* **37** 11-32.
- Buttke TM & Sandstrom PA 1994 Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol Today* **15** 7-10.
- Cam H, Balciunaite E, Blais A, Spektor A, Scarpulla RC, Young R, Kluger Y & Dynlacht BD 2004 A common set of gene regulatory networks links metabolism and growth inhibition. *Mol Cell* **16** 399-411.
- Carelli V, Ross-Cisneros FN & Sadun AA 2004 Mitochondrial dysfunction as a cause of optic neuropathies. *Prog Retin Eye Res* **23** 53-89.
- Català-Niell A, Estrany ME, Proenza AM, Gianotti M & Llado I 2008 Skeletal muscle and liver oxidative metabolism in response to a voluntary isocaloric intake of a high fat diet in male and female rats. *Cell Physiol Biochem* **22** 327-336.
- Cavalcanti-de-Albuquerque JP, Salvador ID, Martins EG, Jardim-Messeder D, Werneck de Castro JP, Galina A & de Carvalho DP 2014 Role of Estrogen on Skeletal Muscle Mitochondrial Function in Ovariectomized Rats: A Time Course Study in Different Fiber Types. *J Appl Physiol* (1985).

- Cipolat S, Martins de Brito O, Dal Zilio B & Scorrano L 2004 OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101** 15927-15932.
- Civitarese AE, Smith SR & Ravussin E 2007 Diet, energy metabolism and mitochondrial biogenesis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **10** 679-687.
- Civitarese AE, Ukropcova B, Carling S, Hulver M, DeFronzo RA, Mandarino L, Ravussin E & Smith SR 2006 Role of adiponectin in human skeletal muscle bioenergetics. *Cell Metab* **4** 75-87.
- Clayton DA 1992 Transcription and replication of animal mitochondrial DNAs. *Int Rev Cytol* **141** 217-232.
- Clayton DA 2000 Vertebrate mitochondrial DNA-a circle of surprises. *Exp Cell Res* **255** 4-9.
- Coen PM & Goodpaster BH 2012 Role of intramyocellular lipids in human health. *Trends Endocrinol Metab* **23** 391-398.
- Colca JR, McDonald WG, Waldon DJ, Leone JW, Lull JM, Bannow CA, Lund ET & Mathews WR 2004 Identification of a novel mitochondrial protein ("mitoNEET") cross-linked specifically by a thiazolidinedione photoprobe. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **286** E252-260.
- Coletta DK, Sriwijitkamol A, Wajcberg E, Tantiwong P, Li M, Prentki M, Madiraju M, Jenkinson CP, Cersosimo E, Musi N, et al. 2009 Pioglitazone stimulates AMP-activated protein kinase signalling and increases the expression of genes involved in adiponectin signalling, mitochondrial function and fat oxidation in human skeletal muscle in vivo: a randomised trial. *Diabetologia* **52** 723-732.
- Colom B, Alcolea MP, Valle A, Oliver J, Roca P & Garcia-Palmer FJ 2007a Skeletal muscle of female rats exhibit higher mitochondrial mass and oxidative-phosphorylative capacities compared to males. *Cell Physiol Biochem* **19** 205-212.
- Colom B, Oliver J, Roca P & Garcia-Palmer FJ 2007b Caloric restriction and gender modulate cardiac muscle mitochondrial H₂O₂ production and oxidative damage. *Cardiovasc Res* **74** 456-465.
- Cortright RN, Chandler MP, Lemon PW & DiCarlo SE 1997 Daily exercise reduces fat, protein and body mass in male but not female rats. *Physiol Behav* **62** 105-111.
- Chen H & Chan DC 2004 Mitochondrial dynamics in mammals. *Curr Top Dev Biol* **59** 119-144.
- Chen H, Detmer SA, Ewald AJ, Griffin EE, Fraser SE & Chan DC 2003 Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol* **160** 189-200.
- Choo HJ, Kim JH, Kwon OB, Lee CS, Mun JY, Han SS, Yoon YS, Yoon G, Choi KM & Ko YG 2006 Mitochondria are impaired in the adipocytes of type 2 diabetic mice. *Diabetologia* **49** 784-791.

- Chu NF, Spiegelman D, Hotamisligil GS, Rifai N, Stampfer M & Rimm EB 2001 Plasma insulin, leptin, and soluble TNF receptors levels in relation to obesity-related atherogenic and thrombogenic cardiovascular disease risk factors among men. *Atherosclerosis* **157** 495-503.
- Daga A, Micol V, Hess D, Aebersold R & Attardi G 1993 Molecular characterization of the transcription termination factor from human mitochondria. *J Biol Chem* **268** 8123-8130.
- Dairaghi DJ, Shadel GS & Clayton DA 1995 Human mitochondrial transcription factor A and promoter spacing integrity are required for transcription initiation. *Biochim Biophys Acta* **1271** 127-134.
- de Oliveira C, de Mattos AB, Silva CB, Mota JF & Zemdegs JC 2012 Nutritional and hormonal modulation of adiponectin and its receptors adipoR1 and adipoR2. *Vitam Horm* **90** 57-94.
- De Pergola G 2000 The adipose tissue metabolism: role of testosterone and dehydroepiandrosterone. *Int J Obes Relat Metab Disord* **24 Suppl 2** S59-63.
- Deepa SS & Dong LQ 2009 APPL1: role in adiponectin signaling and beyond. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **296** E22-36.
- DeFronzo RA, Gunnarsson R, Bjorkman O, Olsson M & Wahren J 1985 Effects of insulin on peripheral and splanchnic glucose metabolism in noninsulin-dependent (type II) diabetes mellitus. *J Clin Invest* **76** 149-155.
- Denzel MS, Scimia MC, Zumstein PM, Walsh K, Ruiz-Lozano P & Ranscht B 2010 T-cadherin is critical for adiponectin-mediated cardioprotection in mice. *J Clin Invest* **120** 4342-4352.
- Detmer SA & Chan DC 2007 Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8** 870-879.
- Dietze-Schroeder D, Sell H, Uhlig M, Koenen M & Eckel J 2005 Autocrine action of adiponectin on human fat cells prevents the release of insulin resistance-inducing factors. *Diabetes* **54** 2003-2011.
- Dieudonne MN, Pecquery R, Leneuve MC & Giudicelli Y 2000 Opposite effects of androgens and estrogens on adipogenesis in rat preadipocytes: evidence for sex and site-related specificities and possible involvement of insulin-like growth factor 1 receptor and peroxisome proliferator-activated receptor gamma2. *Endocrinology* **141** 649-656.
- DiMauro S & Schon EA 2003 Mitochondrial respiratory-chain diseases. *N Engl J Med* **348** 2656-2668.
- Droge W 2002 Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* **82** 47-95.
- Fajas L, Auboeuf D, Raspe E, Schoonjans K, Lefebvre AM, Saladin R, Najib J, Laville M, Fruchart JC, Deeb S, et al. 1997 The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene. *J Biol Chem* **272** 18779-18789.

Falkenberg M, Gaspari M, Rantanen A, Trifunovic A, Larsson NG & Gustafsson CM 2002 Mitochondrial transcription factors B1 and B2 activate transcription of human mtDNA. *Nat Genet* **31** 289-294.

Fernández-Silva P, Enriquez JA & Montoya J 2003 Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA. *Exp Physiol* **88** 41-56.

Fisher RP & Clayton DA 1985 A transcription factor required for promoter recognition by human mitochondrial RNA polymerase. Accurate initiation at the heavy- and light-strand promoters dissected and reconstituted in vitro. *J Biol Chem* **260** 11330-11338.

Fisher RP, Lisowsky T, Parisi MA & Clayton DA 1992 DNA wrapping and bending by a mitochondrial high mobility group-like transcriptional activator protein. *J Biol Chem* **267** 3358-3367.

Fonseca-Alaniz MH, Takada J, Alonso-Vale MI & Lima FB 2007 Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. *J Pediatr (Rio J)* **83** S192-203.

Fraulob JC, Souza-Mello V, Aguila MB & Mandarim-de-Lacerda CA 2012 Beneficial effects of rosuvastatin on insulin resistance, adiposity, inflammatory markers and non-alcoholic fatty liver disease in mice fed on a high-fat diet. *Clin Sci (Lond)* **123** 259-270.

Fridlyand LE & Philipson LH 2006 Reactive species and early manifestation of insulin resistance in type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* **8** 136-145.

Fu Y, Luo N, Klein RL & Garvey WT 2005 Adiponectin promotes adipocyte differentiation, insulin sensitivity, and lipid accumulation. *J Lipid Res* **46** 1369-1379.

Galic S, Oakhill JS & Steinberg GR 2010 Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol* **316** 129-139.

Galloway CA & Yoon Y 2012 Mitochondrial Morphology in Metabolic Diseases. *Antioxid Redox Signal*.

Garesse R & Vallejo CG 2001 Animal mitochondrial biogenesis and function: a regulatory cross-talk between two genomes. *Gene* **263** 1-16.

Garnier A, Fortin D, Delomenie C, Momken I, Veksler V & Ventura-Clapier R 2003 Depressed mitochondrial transcription factors and oxidative capacity in rat failing cardiac and skeletal muscles. *J Physiol* **551** 491-501.

Gastaldelli A, Casolaro A, Pettiti M, Nannipieri M, Ciociaro D, Frascerra S, Buzzigoli E, Baldi S, Mari A & Ferrannini E 2007 Effect of pioglitazone on the metabolic and hormonal response to a mixed meal in type II diabetes. *Clin Pharmacol Ther* **81** 205-212.

Gastaldelli A, Miyazaki Y, Pettiti M, Santini E, Ciociaro D, DeFronzo RA & Ferrannini E 2006 The effect of rosiglitazone on the liver: decreased gluconeogenesis in patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* **91** 806-812.

Ghivizzani SC, Madsen CS, Nelen MR, Ammini CV & Hauswirth WW 1994 In organello footprint analysis of human mitochondrial DNA: human mitochondrial transcription factor A interactions at the origin of replication. *Mol Cell Biol* **14** 7717-7730.

- Giudicelli Y, Dieudonne MN, Lacasa D, Pasquier YN & Pecquery R 1993 Modulation by sex hormones of the membranous transducing system regulating fatty acid mobilization in adipose tissue. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **48** 91-100.
- Gleyzer N, Vercauteren K & Scarpulla RC 2005 Control of mitochondrial transcription specificity factors (TFB1M and TFB2M) by nuclear respiratory factors (NRF-1 and NRF-2) and PGC-1 family coactivators. *Mol Cell Biol* **25** 1354-1366.
- Goffart S & Wiesner RJ 2003 Regulation and co-ordination of nuclear gene expression during mitochondrial biogenesis. *Exp Physiol* **88** 33-40.
- Gogvadze V, Orrenius S & Zhivotovsky B 2009 Mitochondria as targets for chemotherapy. *Apoptosis* **14** 624-640.
- Goldstein BJ, Scalia RG & Ma XL 2009 Protective vascular and myocardial effects of adiponectin. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* **6** 27-35.
- Gómez-Pérez Y, Amengual-Cladera E, Catala-Niell A, Thomas-Moya E, Gianotti M, Proenza AM & Llado I 2008 Gender dimorphism in high-fat-diet-induced insulin resistance in skeletal muscle of aged rats. *Cell Physiol Biochem* **22** 539-548.
- Gómez-Pérez Y, Capllonch-Amer G, Gianotti M, Llado I & Proenza AM 2012 Long-term high-fat-diet feeding induces skeletal muscle mitochondrial biogenesis in rats in a sex-dependent and muscle-type specific manner. *Nutr Metab (Lond)* **9** 15.
- Gómez-Pérez Y, Gianotti M, Llado I & Proenza AM 2011a Sex-dependent effects of high-fat-diet feeding on rat pancreas oxidative stress. *Pancreas* **40** 682-688.
- Gómez-Pérez Y, Gianotti M, Proenza AM & Llado I 2011b Age-related decline of skeletal muscle insulin sensitivity in rats: effect of sex and muscle type. *Rejuvenation Res* **14** 153-161.
- Goodpaster BH 2013 Mitochondrial deficiency is associated with insulin resistance. *Diabetes* **62** 1032-1035.
- Gronemeyer H, Gustafsson JA & Laudet V 2004 Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nat Rev Drug Discov* **3** 950-964.
- Groop LC, Bonadonna RC, DelPrato S, Ratheiser K, Zyck K, Ferrannini E & DeFronzo RA 1989 Glucose and free fatty acid metabolism in non-insulin-dependent diabetes mellitus. Evidence for multiple sites of insulin resistance. *J Clin Invest* **84** 205-213.
- Gugneja S, Virbasius CM & Scarpulla RC 1996 Nuclear respiratory factors 1 and 2 utilize similar glutamine-containing clusters of hydrophobic residues to activate transcription. *Mol Cell Biol* **16** 5708-5716.
- Guilherme A, Virbasius JV, Puri V & Czech MP 2008 Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9** 367-377.
- Gunn HM 1989 Heart weight and running ability. *J Anat* **167** 225-233.

- Gurd BJ, Yoshida Y, Lally J, Holloway GP & Bonen A 2009 The deacetylase enzyme SIRT1 is not associated with oxidative capacity in rat heart and skeletal muscle and its overexpression reduces mitochondrial biogenesis. *J Physiol* **587** 1817-1828.
- Hajer GR, van Haeften TW & Visseren FL 2008 Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *Eur Heart J* **29** 2959-2971.
- Hamden K, Carreau S, Ellouz F, Masmoudi H & El FA 2007 Protective effect of 17beta-estradiol on oxidative stress and liver dysfunction in aged male rats. *J Physiol Biochem* **63** 195-201.
- Hartman HB, Hu X, Tyler KX, Dalal CK & Lazar MA 2002 Mechanisms regulating adipocyte expression of resistin. *J Biol Chem* **277** 19754-19761.
- Harwood HJ, Jr. 2012 The adipocyte as an endocrine organ in the regulation of metabolic homeostasis. *Neuropharmacology* **63** 57-75.
- Heilbronn L, Smith SR & Ravussin E 2004 Failure of fat cell proliferation, mitochondrial function and fat oxidation results in ectopic fat storage, insulin resistance and type II diabetes mellitus. *Int J Obes Relat Metab Disord* **28 Suppl 4** S12-21.
- Henry SL, Bensley JG, Wood-Bradley RJ, Cullen-McEwen LA, Bertram JF & Armitage JA 2012 White adipocytes: more than just fat depots. *Int J Biochem Cell Biol* **44** 435-440.
- Hevener A, Reichart D, Janez A & Olefsky J 2002 Female rats do not exhibit free fatty acid-induced insulin resistance. *Diabetes* **51** 1907-1912.
- Hiroi R, Lacagnina AF, Hinds LR, Carbone DG, Uht RM & Handa RJ 2013 The androgen metabolite, 5alpha-androstane-3beta,17beta-diol (3beta-diol), activates the oxytocin promoter through an estrogen receptor-beta pathway. *Endocrinology* **154** 1802-1812.
- Hoo RL, Chow WS, Yau MH, Xu A, Tso AW, Tse HF, Fong CH, Tam S, Chan L & Lam KS 2007 Adiponectin mediates the suppressive effect of rosiglitazone on plasminogen activator inhibitor-1 production. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27** 2777-2782.
- Hu E, Liang P & Spiegelman BM 1996 AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem* **271** 10697-10703.
- Ibrahim MM 2010 Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obes Rev* **11** 11-18.
- Iwabu M, Yamauchi T, Okada-Iwabu M, Sato K, Nakagawa T, Funata M, Yamaguchi M, Namiki S, Nakayama R, Tabata M, et al. 2010 Adiponectin and AdipoR1 regulate PGC-1alpha and mitochondria by Ca(2+) and AMPK/SIRT1. *Nature* **464** 1313-1319.
- Iwaki M, Matsuda M, Maeda N, Funahashi T, Matsuzawa Y, Makishima M & Shimomura I 2003 Induction of adiponectin, a fat-derived antidiabetic and antiatherogenic factor, by nuclear receptors. *Diabetes* **52** 1655-1663.
- Johannsen DL & Ravussin E 2009 The role of mitochondria in health and disease. *Curr Opin Pharmacol* **9** 780-786.

- Jortay J, Senou M, Abou-Samra M, Noel L, Robert A, Many MC & Brichard SM 2012 Adiponectin and skeletal muscle: pathophysiological implications in metabolic stress. *Am J Pathol* **181** 245-256.
- Joseph AM, Joannisse DR, Baillot RG & Hood DA 2012 Mitochondrial dysregulation in the pathogenesis of diabetes: potential for mitochondrial biogenesis-mediated interventions. *Exp Diabetes Res* **2012** 642038.
- Justo R, Boada J, Frontera M, Oliver J, Bermudez J & Gianotti M 2005a Gender dimorphism in rat liver mitochondrial oxidative metabolism and biogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* **289** C372-378.
- Justo R, Frontera M, Pujol E, Rodriguez-Cuenca S, Llado I, Garcia-Palmer FJ, Roca P & Gianotti M 2005b Gender-related differences in morphology and thermogenic capacity of brown adipose tissue mitochondrial subpopulations. *Life Sci* **76** 1147-1158.
- Kaaman M, Sparks LM, van Harmelen V, Smith SR, Sjolín E, Dahlman I & Arner P 2007 Strong association between mitochondrial DNA copy number and lipogenesis in human white adipose tissue. *Diabetologia* **50** 2526-2533.
- Kadowaki T & Yamauchi T 2005 Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev* **26** 439-451.
- Kamei Y, Suzuki M, Miyazaki H, Tsuboyama-Kasaoka N, Wu J, Ishimi Y & Ezaki O 2005 Ovariectomy in mice decreases lipid metabolism-related gene expression in adipose tissue and skeletal muscle with increased body fat. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* **51** 110-117.
- Kelley DE, Goodpaster B, Wing RR & Simoneau JA 1999 Skeletal muscle fatty acid metabolism in association with insulin resistance, obesity, and weight loss. *Am J Physiol* **277** E1130-1141.
- Kelley DE, He J, Menshikova EV & Ritov VB 2002 Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes* **51** 2944-2950.
- Kelly DP & Scarpulla RC 2004 Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. *Genes Dev* **18** 357-368.
- Kennedy GC 1953 The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **140** 578-596.
- Kim HJ, Kim SK, Shim WS, Lee JH, Hur KY, Kang ES, Ahn CW, Lim SK, Lee HC & Cha BS 2008 Rosiglitazone improves insulin sensitivity with increased serum leptin levels in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* **81** 42-49.
- Kireev RA, Tresguerres AC, Garcia C, Borrás C, Ariznavarreta C, Vara E, Vina J & Tresguerres JA 2010 Hormonal regulation of pro-inflammatory and lipid peroxidation processes in liver of old ovariectomized female rats. *Biogerontology* **11** 229-243.
- Kirkland JL, Hollenberg CH & Gillon WS 1996 Effects of fat depot site on differentiation-dependent gene expression in rat preadipocytes. *Int J Obes Relat Metab Disord* **20 Suppl 3** S102-107.

Ko KM, Chiu PY, Leung HY, Siu AH, Chen N, Leong EP & Poon MK 2010 Long-term dietary supplementation with a yang-invigorating Chinese herbal formula increases lifespan and mitigates age-associated declines in mitochondrial antioxidant status and functional ability of various tissues in male and female C57BL/6J mice. *Rejuvenation Res* **13** 168-171.

Koch A, Thiemann M, Grabenbauer M, Yoon Y, McNiven MA & Schrader M 2003 Dynamin-like protein 1 is involved in peroxisomal fission. *J Biol Chem* **278** 8597-8605.

Koch A, Yoon Y, Bonekamp NA, McNiven MA & Schrader M 2005 A role for Fis1 in both mitochondrial and peroxisomal fission in mammalian cells. *Mol Biol Cell* **16** 5077-5086.

Koh EH, Park JY, Park HS, Jeon MJ, Ryu JW, Kim M, Kim SY, Kim MS, Kim SW, Park IS, et al. 2007 Essential role of mitochondrial function in adiponectin synthesis in adipocytes. *Diabetes* **56** 2973-2981.

Koves TR, Ussher JR, Noland RC, Slentz D, Mosedale M, Ilkayeva O, Bain J, Stevens R, Dyck JR, Newgard CB, et al. 2008 Mitochondrial overload and incomplete fatty acid oxidation contribute to skeletal muscle insulin resistance. *Cell Metab* **7** 45-56.

Krause MP, Liu Y, Vu V, Chan L, Xu A, Riddell MC, Sweeney G & Hawke TJ 2008 Adiponectin is expressed by skeletal muscle fibers and influences muscle phenotype and function. *Am J Physiol Cell Physiol* **295** C203-212.

Kusminski CM & Scherer PE 2012 Mitochondrial dysfunction in white adipose tissue. *Trends Endocrinol Metab* **23** 435-443.

Labrie F 1993 Mechanism of action and pure antiandrogenic properties of flutamide. *Cancer* **72** 3816-3827.

Lee HC & Wei YH 2005 Mitochondrial biogenesis and mitochondrial DNA maintenance of mammalian cells under oxidative stress. *Int J Biochem Cell Biol* **37** 822-834.

Lee HK, Song JH, Shin CS, Park DJ, Park KS, Lee KU & Koh CS 1998 Decreased mitochondrial DNA content in peripheral blood precedes the development of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* **42** 161-167.

Lee YJ, Jeong SY, Karbowski M, Smith CL & Youle RJ 2004 Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in apoptosis. *Mol Biol Cell* **15** 5001-5011.

Lehman JJ, Barger PM, Kovacs A, Saffitz JE, Medeiros DM & Kelly DP 2000 Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis. *J Clin Invest* **106** 847-856.

Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM & Kliewer SA 1995 An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem* **270** 12953-12956.

Lehr S, Hartwig S & Sell H 2012 Adipokines: a treasure trove for the discovery of biomarkers for metabolic disorders. *Proteomics Clin Appl* **6** 91-101.

Lehrke M & Lazar MA 2005 The many faces of PPARgamma. *Cell* **123** 993-999.

- Leone TC, Lehman JJ, Finck BN, Schaeffer PJ, Wende AR, Boudina S, Courtois M, Wozniak DF, Sambandam N, Bernal-Mizrachi C, et al. 2005 PGC-1alpha deficiency causes multi-system energy metabolic derangements: muscle dysfunction, abnormal weight control and hepatic steatosis. *PLoS Biol* **3** e101.
- Li W & Kong AN 2009 Molecular mechanisms of Nrf2-mediated antioxidant response. *Mol Carcinog* **48** 91-104.
- Liesa M, Borda-d'Agua B, Medina-Gomez G, Lelliott CJ, Paz JC, Rojo M, Palacin M, Vidal-Puig A & Zorzano A 2008 Mitochondrial fusion is increased by the nuclear coactivator PGC-1beta. *PLoS One* **3** e3613.
- Liesa M, Palacin M & Zorzano A 2009 Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. *Physiol Rev* **89** 799-845.
- Lihn AS, Pedersen SB & Richelsen B 2005 Adiponectin: action, regulation and association to insulin sensitivity. *Obes Rev* **6** 13-21.
- Lin J, Handschin C & Spiegelman BM 2005 Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab* **1** 361-370.
- Lin J, Tarr PT, Yang R, Rhee J, Puigserver P, Newgard CB & Spiegelman BM 2003 PGC-1beta in the regulation of hepatic glucose and energy metabolism. *J Biol Chem* **278** 30843-30848.
- Lin KD, Chang YH, Wang CL, Yang YH, Hsiao PJ, Li TH & Shin SJ 2008 Thiazolidinedione addition reduces the serum retinol-binding protein 4 in type 2 diabetic patients treated with metformin and sulfonylurea. *Transl Res* **151** 309-314.
- Lindinger A, Peterli R, Peters T, Kern B, von Flue M, Calame M, Hoch M, Eberle AN & Lindinger PW 2010 Mitochondrial DNA content in human omental adipose tissue. *Obes Surg* **20** 84-92.
- Lionetti L, Mollica MP, Lombardi A, Cavaliere G, Gifuni G & Barletta A 2009 From chronic overnutrition to insulin resistance: the role of fat-storing capacity and inflammation. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* **19** 146-152.
- Liu Y, Chewchuk S, Lavigne C, Brule S, Pilon G, Houde V, Xu A, Marette A & Sweeney G 2009a Functional significance of skeletal muscle adiponectin production, changes in animal models of obesity and diabetes, and regulation by rosiglitazone treatment. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **297** E657-664.
- Liu YH, Huang Y & Shao X 2009b Effects of estrogen on genioglossal muscle contractile properties and fiber-type distribution in chronic intermittent hypoxia rats. *Eur J Oral Sci* **117** 685-690.
- Liu YH, Jia SS & Hou YX 2009c Effects of ovariectomy on rat genioglossal muscle contractile properties and fiber-type distribution. *Angle Orthod* **79** 509-514.
- Lombard DB, Alt FW, Cheng HL, Bunkenborg J, Streeper RS, Mostoslavsky R, Kim J, Yancopoulos G, Valenzuela D, Murphy A, et al. 2007 Mammalian Sir2 homolog SIRT3 regulates global mitochondrial lysine acetylation. *Mol Cell Biol* **27** 8807-8814.

- Lowell BB & Shulman GI 2005 Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. *Science* **307** 384-387.
- Lu RH, Ji H, Chang ZG, Su SS & Yang GS 2010 Mitochondrial development and the influence of its dysfunction during rat adipocyte differentiation. *Mol Biol Rep* **37** 2173-2182.
- Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y & Matsubara K 1996 cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *Biochem Biophys Res Commun* **221** 286-289.
- Maeda N, Funahashi T & Shimomura I 2013 Cardiovascular-metabolic impact of adiponectin and aquaporin. *Endocr J* **60** 251-259.
- Mailloux RJ & Harper ME 2012 Mitochondrial proticity and ROS signaling: lessons from the uncoupling proteins. *Trends Endocrinol Metab* **23** 451-458.
- Malik AN & Czajka A 2012 Is mitochondrial DNA content a potential biomarker of mitochondrial dysfunction? *Mitochondrion*.
- Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Bugianesi E, Lenzi M, McCullough AJ, Natale S, Forlani G & Melchionda N 2001 Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes* **50** 1844-1850.
- Mariman EC & Wang P 2010 Adipocyte extracellular matrix composition, dynamics and role in obesity. *Cell Mol Life Sci* **67** 1277-1292.
- Matsakas A & Patel K 2009 Intracellular signalling pathways regulating the adaptation of skeletal muscle to exercise and nutritional changes. *Histol Histopathol* **24** 209-222.
- Mattingly KA, Ivanova MM, Riggs KA, Wickramasinghe NS, Barch MJ & Klinge CM 2008 Estradiol stimulates transcription of nuclear respiratory factor-1 and increases mitochondrial biogenesis. *Mol Endocrinol* **22** 609-622.
- Mayerson AB, Hundal RS, Dufour S, Lebon V, Befroy D, Cline GW, Enocksson S, Inzucchi SE, Shulman GI & Petersen KF 2002 The effects of rosiglitazone on insulin sensitivity, lipolysis, and hepatic and skeletal muscle triglyceride content in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* **51** 797-802.
- McCulloch V & Shadel GS 2003 Human mitochondrial transcription factor B1 interacts with the C-terminal activation region of h-mtTFA and stimulates transcription independently of its RNA methyltransferase activity. *Mol Cell Biol* **23** 5816-5824.
- Meirhaeghe A, Crowley V, Lenaghan C, Lelliott C, Green K, Stewart A, Hart K, Schinner S, Sethi JK, Yeo G, et al. 2003 Characterization of the human, mouse and rat PGC1 beta (peroxisome-proliferator-activated receptor-gamma co-activator 1 beta) gene in vitro and in vivo. *Biochem J* **373** 155-165.
- Miyakawa I, Aoi H, Sando N & Kuroiwa T 1984 Fluorescence microscopic studies of mitochondrial nucleoids during meiosis and sporulation in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci* **66** 21-38.

- Miyazaki Y, Mahankali A, Matsuda M, Mahankali S, Hardies J, Cusi K, Mandarino LJ & DeFronzo RA 2002 Effect of pioglitazone on abdominal fat distribution and insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab* **87** 2784-2791.
- Mizutani T, Nishikawa Y, Adachi H, Enomoto T, Ikegami H, Kurachi H, Nomura T & Miyake A 1994 Identification of estrogen receptor in human adipose tissue and adipocytes. *J Clin Endocrinol Metab* **78** 950-954.
- Monjo M, Pujol E & Roca P 2005 alpha2- to beta3-Adrenoceptor switch in 3T3-L1 preadipocytes and adipocytes: modulation by testosterone, 17beta-estradiol, and progesterone. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **289** E145-150.
- Moraes CT 2001 What regulates mitochondrial DNA copy number in animal cells? *Trends Genet* **17** 199-205.
- Moran AL, Nelson SA, Landisch RM, Warren GL & Lowe DA 2007 Estradiol replacement reverses ovariectomy-induced muscle contractile and myosin dysfunction in mature female mice. *J Appl Physiol* **102** 1387-1393.
- Moran AL, Warren GL & Lowe DA 2006 Removal of ovarian hormones from mature mice detrimentally affects muscle contractile function and myosin structural distribution. *J Appl Physiol* **100** 548-559.
- Moreira PI, Custodio JB, Nunes E, Oliveira PJ, Moreno A, Seica R, Oliveira CR & Santos MS 2011 Mitochondria from distinct tissues are differently affected by 17beta-estradiol and tamoxifen. *J Steroid Biochem Mol Biol* **123** 8-16.
- Morino K, Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Frattini J, Shatzkes N, Neschen S, White MF, Bilz S, Sono S, et al. 2005 Reduced mitochondrial density and increased IRS-1 serine phosphorylation in muscle of insulin-resistant offspring of type 2 diabetic parents. *J Clin Invest* **115** 3587-3593.
- Motoshima H, Wu X, Mahadev K & Goldstein BJ 2004 Adiponectin suppresses proliferation and superoxide generation and enhances eNOS activity in endothelial cells treated with oxidized LDL. *Biochem Biophys Res Commun* **315** 264-271.
- Moustafa AM & Boshra V 2011 The possible role of L-carnitine on the skeletal muscle of ovariectomized rats. *J Mol Histol* **42** 217-225.
- Murphy WI, Attardi B, Tu C & Attardi G 1975 Evidence for complete symmetrical transcription in vivo of mitochondrial DNA in HeLa cells. *J Mol Biol* **99** 809-814.
- Nadal-Casellas A, Amengual-Cladera E, Proenza AM, Llado I & Gianotti M 2010 Long-term high-fat-diet feeding impairs mitochondrial biogenesis in liver of male and female rats. *Cell Physiol Biochem* **26** 291-302.
- Nadal-Casellas A, Proenza AM, Gianotti M & Lladó I 2011a Brown adipose tissue redox status in response to dietary-induced obesity-associated oxidative stress in male and female rats. *Stress* **14** 174-184.

Nadal-Casellas A, Proenza AM, Llado I & Gianotti M 2011b Effects of ovariectomy and 17-beta estradiol replacement on rat brown adipose tissue mitochondrial function. *Steroids* **76** 1051-1056.

Nadal-Casellas A, Proenza AM, Llado I & Gianotti M 2012 Sex-dependent differences in rat hepatic lipid accumulation and insulin sensitivity in response to diet-induced obesity. *Biochem Cell Biol* **90** 164-172.

Nakada K, Sato A & Hayashi J 2009 Mitochondrial functional complementation in mitochondrial DNA-based diseases. *Int J Biochem Cell Biol* **41** 1907-1913.

Nakano Y, Tobe T, Choi-Miura NH, Mazda T & Tomita M 1996 Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. *J Biochem* **120** 803-812.

Niemann B, Chen Y, Teschner M, Li L, Silber RE & Rohrbach S 2011 Obesity induces signs of premature cardiac aging in younger patients: the role of mitochondria. *J Am Coll Cardiol* **57** 577-585.

Nishida M, Funahashi T & Shimomura I 2007 Pathophysiological significance of adiponectin. *Med Mol Morphol* **40** 55-67.

Nishizawa H, Shimomura I, Kishida K, Maeda N, Kuriyama H, Nagaretani H, Matsuda M, Kondo H, Furuyama N, Kihara S, et al. 2002 Androgens decrease plasma adiponectin, an insulin-sensitizing adipocyte-derived protein. *Diabetes* **51** 2734-2741.

Nisoli E, Clementi E, Moncada S & Carruba MO 2004 Mitochondrial biogenesis as a cellular signaling framework. *Biochem Pharmacol* **67** 1-15.

O'Brien SN, Welter BH, Mantzke KA & Price TM 1998 Identification of progesterone receptor in human subcutaneous adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab* **83** 509-513.

O'Lone R, Knorr K, Jaffe IZ, Schaffer ME, Martini PG, Karas RH, Bienkowska J, Mendelsohn ME & Hansen U 2007 Estrogen receptors alpha and beta mediate distinct pathways of vascular gene expression, including genes involved in mitochondrial electron transport and generation of reactive oxygen species. *Mol Endocrinol* **21** 1281-1296.

Ohlson LO, Larsson B, Svardstam K, Welin L, Eriksson H, Wilhelmsen L, Bjorntorp P & Tibblin G 1985 The influence of body fat distribution on the incidence of diabetes mellitus. 13.5 years of follow-up of the participants in the study of men born in 1913. *Diabetes* **34** 1055-1058.

Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Maeda K, Kuriyama H, Okamoto Y, Hotta K, Nishida M, Takahashi M, Nakamura T, et al. 1999 Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation* **100** 2473-2476.

Pantaleo TU, Mousovich F, Rosenthal D, Padron AS, Carvalho DP & da Costa VM 2010 Effect of serum estradiol and leptin levels on thyroid function, food intake and body weight gain in female Wistar rats. *Steroids* **75** 638-642.

Papaetis GS, Orphanidou D & Panagiotou TN 2011 Thiazolidinediones and type 2 diabetes: from cellular targets to cardiovascular benefit. *Curr Drug Targets* **12** 1498-1512.

Pardo R, Enguix N, Lasheras J, Feliu JE, Kralli A & Villena JA 2011 Rosiglitazone-induced mitochondrial biogenesis in white adipose tissue is independent of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha. *PLoS One* **6** e26989.

Parisi MA & Clayton DA 1991 Similarity of human mitochondrial transcription factor 1 to high mobility group proteins. *Science* **252** 965-969.

Patel L, Buckels AC, Kinghorn IJ, Murdock PR, Holbrook JD, Plumpton C, Macphee CH & Smith SA 2003 Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR gamma activators. *Biochem Biophys Res Commun* **300** 472-476.

Patel SA, Hoehn KL, Lawrence RT, Sawbridge L, Talbot NA, Tomsig JL, Turner N, Cooney GJ, Whitehead JP, Kraegen EW, et al. 2012 Overexpression of the adiponectin receptor AdipoR1 in rat skeletal muscle amplifies local insulin sensitivity. *Endocrinology* **153** 5231-5246.

Paturi S, Gutta AK, Katta A, Kakarla SK, Arvapalli RK, Gadde MK, Nalabotu SK, Rice KM, Wu M & Blough E 2010 Effects of aging and gender on muscle mass and regulation of Akt-mTOR-p70s6k related signaling in the F344BN rat model. *Mech Ageing Dev* **131** 202-209.

Pecquery R, Dieudonne MN, Leneuve MC & Giudicelli Y 1990 Evidence that testosterone modulates in vivo the adenylate cyclase activity in fat cells. *Endocrinology* **126** 241-245.

Pedersen SB, Kristensen K, Hermann PA, Katzenellenbogen JA & Richelsen B 2004 Estrogen controls lipolysis by up-regulating alpha2A-adrenergic receptors directly in human adipose tissue through the estrogen receptor alpha. Implications for the female fat distribution. *J Clin Endocrinol Metab* **89** 1869-1878.

Peralta S, Wang X & Moraes CT 2012 Mitochondrial transcription: lessons from mouse models. *Biochim Biophys Acta* **1819** 961-969.

Perdomo G, Commerford SR, Richard AM, Adams SH, Corkey BE, O'Doherty RM & Brown NF 2004 Increased beta-oxidation in muscle cells enhances insulin-stimulated glucose metabolism and protects against fatty acid-induced insulin resistance despite intramyocellular lipid accumulation. *J Biol Chem* **279** 27177-27186.

Perrier S & Jarde T 2012 Adiponectin, an anti-carcinogenic hormone? A systematic review on breast, colorectal, liver and prostate cancer. *Curr Med Chem* **19** 5501-5512.

Phielix E, Szendroedi J & Roden M 2011 The role of metformin and thiazolidinediones in the regulation of hepatic glucose metabolism and its clinical impact. *Trends Pharmacol Sci* **32** 607-616.

Picard M, Csukly K, Robillard ME, Godin R, Ascah A, Bourcier-Lucas C & Burelle Y 2008 Resistance to Ca²⁺-induced opening of the permeability transition pore differs in mitochondria from glycolytic and oxidative muscles. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **295** R659-668.

Picard M, Hepple RT & Burelle Y 2012 Mitochondrial functional specialization in glycolytic and oxidative muscle fibers: tailoring the organelle for optimal function. *Am J Physiol Cell Physiol* **302** C629-641.

- Pond CM & Mattacks CA 1991 The effects of noradrenaline and insulin on lipolysis in adipocytes isolated from nine different adipose depots of guinea-pigs. *Int J Obes* **15** 609-618.
- Pratesi A, Tarantini F & Di Bari M 2013 Skeletal muscle: an endocrine organ. *Clin Cases Miner Bone Metab* **10** 11-14.
- Prins JB & O'Rahilly S 1997 Regulation of adipose cell number in man. *Clin Sci (Lond)* **92** 3-11.
- Puigserver P & Spiegelman BM 2003 Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr Rev* **24** 78-90.
- Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M & Spiegelman BM 1998 A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* **92** 829-839.
- Rabe K, Lehrke M, Parhofer KG & Broedl UC 2008 Adipokines and insulin resistance. *Mol Med* **14** 741-751.
- Ramamani A, Aruldas MM & Govindarajulu P 1999 Impact of testosterone and oestradiol on region specificity of skeletal muscle-ATP, creatine phosphokinase and myokinase in male and female Wistar rats. *Acta Physiol Scand* **166** 91-97.
- Ran J, Hirano T, Fukui T, Saito K, Kageyama H, Okada K & Adachi M 2006 Angiotensin II infusion decreases plasma adiponectin level via its type 1 receptor in rats: an implication for hypertension-related insulin resistance. *Metabolism* **55** 478-488.
- Ratziu V, Charlotte F, Bernhardt C, Giral P, Halbron M, Lenaour G, Hartmann-Heurtier A, Bruckert E & Poynard T 2010 Long-term efficacy of rosiglitazone in nonalcoholic steatohepatitis: results of the fatty liver improvement by rosiglitazone therapy (FLIRT 2) extension trial. *Hepatology* **51** 445-453.
- Rebelo AP, Williams SL & Moraes CT 2009 In vivo methylation of mtDNA reveals the dynamics of protein-mtDNA interactions. *Nucleic Acids Res* **37** 6701-6715.
- Renis M, Cantatore P, Loguercio Polosa P, Fracasso F & Gadaleta MN 1989 Content of mitochondrial DNA and of three mitochondrial RNAs in developing and adult rat cerebellum. *J Neurochem* **52** 750-754.
- Riestra P, Garcia-Anguita A, Ortega L & Garces C 2013 Relationship of adiponectin with sex hormone levels in adolescents. *Horm Res Paediatr* **79** 83-87.
- Rimbert V, Boirie Y, Bedu M, Hocquette JF, Ritz P & Morio B 2004 Muscle fat oxidative capacity is not impaired by age but by physical inactivity: association with insulin sensitivity. *FASEB J* **18** 737-739.
- Rodríguez-Cuenca S, Monjo M, Proenza AM & Roca P 2005 Depot differences in steroid receptor expression in adipose tissue: possible role of the local steroid milieu. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **288** E200-207.

- Rodríguez-Cuenca S, Pujol E, Justo R, Frontera M, Oliver J, Gianotti M & Roca P 2002 Sex-dependent thermogenesis, differences in mitochondrial morphology and function, and adrenergic response in brown adipose tissue. *J Biol Chem* **277** 42958-42963.
- Romero Mdel M, Fernandez-Lopez JA, Esteve M & Alemany M 2009 Different modulation by dietary restriction of adipokine expression in white adipose tissue sites in the rat. *Cardiovasc Diabetol* **8** 42.
- Rong JX, Qiu Y, Hansen MK, Zhu L, Zhang V, Xie M, Okamoto Y, Mattie MD, Higashiyama H, Asano S, et al. 2007 Adipose mitochondrial biogenesis is suppressed in db/db and high-fat diet-fed mice and improved by rosiglitazone. *Diabetes* **56** 1751-1760.
- Ronti T, Lupattelli G & Mannarino E 2006 The endocrine function of adipose tissue: an update. *Clin Endocrinol (Oxf)* **64** 355-365.
- Rosen ED & Spiegelman BM 2001 PPARgamma : a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth. *J Biol Chem* **276** 37731-37734.
- Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P & Spiegelman BM 2000 Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev* **14** 1293-1307.
- Rosenfeld MG, Lunyak VV & Glass CK 2006 Sensors and signals: a coactivator/corepressor/epigenetic code for integrating signal-dependent programs of transcriptional response. *Genes Dev* **20** 1405-1428.
- Rottenberg H & Wu S 1998 Quantitative assay by flow cytometry of the mitochondrial membrane potential in intact cells. *Biochim Biophys Acta* **1404** 393-404.
- Ruiz-Larrea MB, Leal AM, Martin C, Martinez R & Lacort M 1997 Antioxidant action of estrogens in rat hepatocytes. *Rev Esp Fisiol* **53** 225-229.
- Scarpulla RC 2002a Transcriptional activators and coactivators in the nuclear control of mitochondrial function in mammalian cells. *Gene* **286** 81-89.
- Scarpulla RC 2002b Nuclear activators and coactivators in mammalian mitochondrial biogenesis. *Biochim Biophys Acta* **1576** 1-14.
- Scarpulla RC 2006 Nuclear control of respiratory gene expression in mammalian cells. *J Cell Biochem* **97** 673-683.
- Scarpulla RC 2011 Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network. *Biochim Biophys Acta* **1813** 1269-1278.
- Schapira AH 1998 Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative disorders. *Biochim Biophys Acta* **1366** 225-233.
- Scherer PE 2006 Adipose tissue: from lipid storage compartment to endocrine organ. *Diabetes* **55** 1537-1545.
- Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G & Lodish HF 1995 A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem* **270** 26746-26749.

- Schoonjans K & Auwerx J 2000 Thiazolidinediones: an update. *Lancet* **355** 1008-1010.
- Schwer B, Bunkenborg J, Verdin RO, Andersen JS & Verdin E 2006 Reversible lysine acetylation controls the activity of the mitochondrial enzyme acetyl-CoA synthetase 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103** 10224-10229.
- Sebastian D, Hernandez-Alvarez MI, Segales J, Sorianello E, Munoz JP, Sala D, Waget A, Liesa M, Paz JC, Gopalacharyulu P, et al. 2012 Mitofusin 2 (Mfn2) links mitochondrial and endoplasmic reticulum function with insulin signaling and is essential for normal glucose homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109** 5523-5528.
- Shadel GS & Clayton DA 1997 Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates. *Annu Rev Biochem* **66** 409-435.
- Shay JW, Pierce DJ & Werbin H 1990 Mitochondrial DNA copy number is proportional to total cell DNA under a variety of growth conditions. *J Biol Chem* **265** 14802-14807.
- Shulman GI 2000 Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* **106** 171-176.
- Simpson ER 2003 Sources of estrogen and their importance. *J Steroid Biochem Mol Biol* **86** 225-230.
- Smirnova E, Griparic L, Shurland DL & van der Bliek AM 2001 Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol Biol Cell* **12** 2245-2256.
- Spiegelman BM 1998 PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes* **47** 507-514.
- Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS & Lazar MA 2001 The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* **409** 307-312.
- Subramanian V & Ferrante AW, Jr. 2009 Obesity, inflammation, and macrophages. *Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program* **63** 151-159; discussion 159-162, 259-168.
- Tajiri Y, Takei R, Mimura K & Umeda F 2007 Indicators for the efficacy of pioglitazone before and during treatment in Japanese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Technol Ther* **9** 429-437.
- Takamatsu C, Umeda S, Ohsato T, Ohno T, Abe Y, Fukuoh A, Shinagawa H, Hamasaki N & Kang D 2002 Regulation of mitochondrial D-loops by transcription factor A and single-stranded DNA-binding protein. *EMBO Rep* **3** 451-456.
- Tcherepanova I, Puigserver P, Norris JD, Spiegelman BM & McDonnell DP 2000 Modulation of estrogen receptor-alpha transcriptional activity by the coactivator PGC-1. *J Biol Chem* **275** 16302-16308.
- Terada S, Kawanaka K, Goto M, Shimokawa T & Tabata I 2005 Effects of high-intensity intermittent swimming on PGC-1alpha protein expression in rat skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* **184** 59-65.
- Tiidus PM 2000 Estrogen and gender effects on muscle damage, inflammation, and oxidative stress. *Can J Appl Physiol* **25** 274-287.

- Tilg H & Moschen AR 2006 Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* **6** 772-783.
- Tiranti V, Savoia A, Forti F, D'Apolito MF, Centra M, Rocchi M & Zeviani M 1997 Identification of the gene encoding the human mitochondrial RNA polymerase (h-mtRPOL) by cyberscreening of the Expressed Sequence Tags database. *Hum Mol Genet* **6** 615-625.
- Tsao TS, Lodish HF & Fruebis J 2002 ACRP30, a new hormone controlling fat and glucose metabolism. *Eur J Pharmacol* **440** 213-221.
- Twig G, Elorza A, Molina AJ, Mohamed H, Wikstrom JD, Walzer G, Stiles L, Haigh SE, Katz S, Las G, et al. 2008 Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J* **27** 433-446.
- Valle A, Garcia-Palmer FJ, Oliver J & Roca P 2007a Sex differences in brown adipose tissue thermogenic features during caloric restriction. *Cell Physiol Biochem* **19** 195-204.
- Valle A, Guevara R, Garcia-Palmer FJ, Roca P & Oliver J 2007b Sexual dimorphism in liver mitochondrial oxidative capacity is conserved under caloric restriction conditions. *Am J Physiol Cell Physiol* **293** C1302-1308.
- Van Harmelen V, Reynisdottir S, Eriksson P, Thorne A, Hoffstedt J, Lonnqvist F & Arner P 1998 Leptin secretion from subcutaneous and visceral adipose tissue in women. *Diabetes* **47** 913-917.
- Ventura-Clapier R, Garnier A & Veksler V 2008 Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1alpha. *Cardiovasc Res* **79** 208-217.
- Vidal-Puig AJ, Grujic D, Zhang CY, Hagen T, Boss O, Ido Y, Szczepanik A, Wade J, Mootha V, Cortright R, et al. 2000 Energy metabolism in uncoupling protein 3 gene knockout mice. *J Biol Chem* **275** 16258-16266.
- Virbasius CA, Virbasius JV & Scarpulla RC 1993a NRF-1, an activator involved in nuclear-mitochondrial interactions, utilizes a new DNA-binding domain conserved in a family of developmental regulators. *Genes Dev* **7** 2431-2445.
- Virbasius JV, Virbasius CA & Scarpulla RC 1993b Identity of GABP with NRF-2, a multisubunit activator of cytochrome oxidase expression, reveals a cellular role for an ETS domain activator of viral promoters. *Genes Dev* **7** 380-392.
- Wade GN, Gray JM & Bartness TJ 1985 Gonadal influences on adiposity. *Int J Obes* **9 Suppl 1** 83-92.
- Wallace DC 1999 Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* **283** 1482-1488.
- Wang CH, Wang CC, Huang HC & Wei YH 2013 Mitochondrial dysfunction leads to impairment of insulin sensitivity and adiponectin secretion in adipocytes. *FEBS J* **280** 1039-1050.
- Wang Y, Lam KS, Chan L, Chan KW, Lam JB, Lam MC, Hoo RC, Mak WW, Cooper GJ & Xu A 2006a Post-translational modifications of the four conserved lysine residues within

the collagenous domain of adiponectin are required for the formation of its high molecular weight oligomeric complex. *J Biol Chem* **281** 16391-16400.

Wang Y, Xu LY, Lam KS, Lu G, Cooper GJ & Xu A 2006b Proteomic characterization of human serum proteins associated with the fat-derived hormone adiponectin. *Proteomics* **6** 3862-3870.

Way JM, Gorgun CZ, Tong Q, Uysal KT, Brown KK, Harrington WW, Oliver WR, Jr., Willson TM, Kliwer SA & Hotamisligil GS 2001 Adipose tissue resistin expression is severely suppressed in obesity and stimulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *J Biol Chem* **276** 25651-25653.

Westerblad H, Bruton JD & Katz A 2010 Skeletal muscle: energy metabolism, fiber types, fatigue and adaptability. *Exp Cell Res* **316** 3093-3099.

Westerink J & Visseren FL 2011 Pharmacological and non-pharmacological interventions to influence adipose tissue function. *Cardiovasc Diabetol* **10** 13.

Wiesner RJ, Kurowski TT & Zak R 1992 Regulation by thyroid hormone of nuclear and mitochondrial genes encoding subunits of cytochrome-c oxidase in rat liver and skeletal muscle. *Mol Endocrinol* **6** 1458-1467.

Wildman RP, Wang D, Fernandez I, Mancuso P, Santoro N, Scherer PE & Sowers MR 2013 Associations of testosterone and sex hormone binding globulin with adipose tissue hormones in midlife women. *Obesity (Silver Spring)* **21** 629-636.

Wiley SE, Murphy AN, Ross SA, van der Geer P & Dixon JE 2007a MitoNEET is an iron-containing outer mitochondrial membrane protein that regulates oxidative capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104** 5318-5323.

Wiley SE, Paddock ML, Abresch EC, Gross L, van der Geer P, Nechushtai R, Murphy AN, Jennings PA & Dixon JE 2007b The outer mitochondrial membrane protein mitoNEET contains a novel redox-active 2Fe-2S cluster. *J Biol Chem* **282** 23745-23749.

Wilson-Fritch L, Burkart A, Bell G, Mendelson K, Leszyk J, Nicoloso S, Czech M & Corvera S 2003 Mitochondrial biogenesis and remodeling during adipogenesis and in response to the insulin sensitizer rosiglitazone. *Mol Cell Biol* **23** 1085-1094.

Wilson-Fritch L, Nicoloso S, Chouinard M, Lazar MA, Chui PC, Leszyk J, Straubhaar J, Czech MP & Corvera S 2004 Mitochondrial remodeling in adipose tissue associated with obesity and treatment with rosiglitazone. *J Clin Invest* **114** 1281-1289.

Williams RS, Salmons S, Newsholme EA, Kaufman RE & Mellor J 1986 Regulation of nuclear and mitochondrial gene expression by contractile activity in skeletal muscle. *J Biol Chem* **261** 376-380.

Willson TM, Brown PJ, Sternbach DD & Henke BR 2000 The PPARs: from orphan receptors to drug discovery. *J Med Chem* **43** 527-550.

Wronska A & Kmiec Z 2012 Structural and biochemical characteristics of various white adipose tissue depots. *Acta Physiol (Oxf)* **205** 194-208.

- Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V, Troy A, Cinti S, Lowell B, Scarpulla RC, et al. 1999 Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* **98** 115-124.
- Xu A, Chan KW, Hoo RL, Wang Y, Tan KC, Zhang J, Chen B, Lam MC, Tse C, Cooper GJ, et al. 2005 Testosterone selectively reduces the high molecular weight form of adiponectin by inhibiting its secretion from adipocytes. *J Biol Chem* **280** 18073-18080.
- Xu X, De Pergola G & Bjorntorp P 1990 The effects of androgens on the regulation of lipolysis in adipose precursor cells. *Endocrinology* **126** 1229-1234.
- Xu XF, De Pergola G & Bjorntorp P 1991 Testosterone increases lipolysis and the number of beta-adrenoceptors in male rat adipocytes. *Endocrinology* **128** 379-382.
- Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K, Tsunoda M, et al. 2003a Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* **423** 762-769.
- Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, et al. 2002 Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* **8** 1288-1295.
- Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Imai Y, Shimozawa N, Hioki K, Uchida S, Ito Y, Takakuwa K, Matsui J, et al. 2003b Globular adiponectin protected ob/ob mice from diabetes and ApoE-deficient mice from atherosclerosis. *J Biol Chem* **278** 2461-2468.
- Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, et al. 2001 The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat Med* **7** 941-946.
- Yang SH, Liu R, Perez EJ, Wen Y, Stevens SM, Jr., Valencia T, Brun-Zinkernagel AM, Prokai L, Will Y, Dykens J, et al. 2004 Mitochondrial localization of estrogen receptor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101** 4130-4135.
- Yoon Y, Krueger EW, Oswald BJ & McNiven MA 2003 The mitochondrial protein hFis1 regulates mitochondrial fission in mammalian cells through an interaction with the dynamin-like protein DLP1. *Mol Cell Biol* **23** 5409-5420.
- Yu J, Zhao Y, Li B, Sun L & Huo H 2012 17beta-estradiol regulates the expression of antioxidant enzymes in myocardial cells by increasing Nrf2 translocation. *J Biochem Mol Toxicol* **26** 264-269.
- Yu M 2011 Generation, function and diagnostic value of mitochondrial DNA copy number alterations in human cancers. *Life Sci* **89** 65-71.
- Zhan M, Brooks C, Liu F, Sun L & Dong Z 2013 Mitochondrial dynamics: regulatory mechanisms and emerging role in renal pathophysiology. *Kidney Int* **83** 568-581.
- Zhang H & Zhang C 2010 Adipose "talks" to distant organs to regulate insulin sensitivity and vascular function. *Obesity (Silver Spring)* **18** 2071-2076.

Zhao H, Tian Z, Hao J & Chen B 2005 Extragonadal aromatization increases with time after ovariectomy in rats. *Reprod Biol Endocrinol* **3** 6.

Zhou R, Yazdi AS, Menu P & Tschopp J 2011 A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* **469** 221-225.

Zierath JR & Hawley JA 2004 Skeletal muscle fiber type: influence on contractile and metabolic properties. *PLoS Biol* **2** e348.

Zorzano A, Liesa M & Palacin M 2009 Role of mitochondrial dynamics proteins in the pathophysiology of obesity and type 2 diabetes. *Int J Biochem Cell Biol* **41** 1846-1854.



Relación de tablas y figuras

8.1. RELACIÓN DE TABLAS

Tabla 1.- Algunas adipoquinas y sus principales funciones conocidas.....	24
Tabla 2.- Tratamientos aplicados a las líneas celulares.....	60
Tabla 3.- Volúmenes de reactivo necesarios para preparar los geles de acrilamida según la concentración final deseada.....	71
Tabla 4.- Relación de anticuerpos primarios utilizados en las diferentes muestras analizadas y condiciones.....	72
Tabla 5.- Secuencias de los cebadores de rata utilizados y detalles de las condiciones de amplificación.....	78
Tabla 6.- Secuencias de los cebadores de ratón utilizados y detalles de las condiciones de amplificación.....	79
Tabla 7.- Tabla de variación de la longitud del paso óptico de una placa de 96 pocillos en función del volumen de muestra.....	81
Tabla 8.- Efecto de las hormonas sexuales sobre los marcadores de biogénesis y función mitocondriales en los adipocitos blancos 3T3-L1.....	95
Tabla 9.- Efecto de la ovariectomía y del reemplazo de estradiol en los niveles séricos de hormonas sexuales, adipoquinas y NEFA.....	111
Tabla 10.- Efecto de la ovariectomía y del reemplazo de estradiol sobre el peso corporal y el peso del gastrocnemius, el índice de adiposidad y la composición del músculo gastrocnemius blanco.....	111
Tabla 11.- Efecto de la ovariectomía y del reemplazo de estradiol sobre los marcadores de capacidad oxidativa mitocondrial en el músculo gastrocnemius blanco.....	113
Tabla 12.- Efecto de la ovariectomía y del reemplazo de estradiol sobre los marcadores de estrés oxidativo en el músculo gastrocnemius blanco.....	113
Tabla 13.- Efecto de la ovariectomía y del reemplazo de estradiol sobre la expresión de los marcadores de función, biogénesis y dinámica mitocondriales en el músculo gastrocnemius blanco.....	114

Tabla 14.- Efecto de la dieta y del tratamiento con rosiglitazona sobre el peso corporal y del TAB gonadal, el índice de adiposidad y la ingesta calórica.....	129
Tabla 15.- Efecto de la dieta y del tratamiento con rosiglitazona sobre los parámetros séricos.....	131
Tabla 16.- Efecto del tratamiento con rosiglitazona sobre los marcadores de función y biogénesis mitocondriales en el TAB gonadal.....	132
Tabla 17.- Efecto de la rosiglitazona sobre los indicadores de contenido y función mitocondrial en adipocitos blancos 3T3-L1.....	134
Tabla 18.- Efecto de la rosiglitazona sobre los niveles de ARNm de los marcadores de biogénesis y dinámica mitocondriales en adipocitos blancos 3T3-L1.....	134
Tabla 19.- Efecto de la rosiglitazona sobre los niveles de ARNm de adipoquinas y receptores de adiponectina en adipocitos blancos 3T3-L1...	136
Tabla 20.- Efecto de la antimicina sobre los niveles de adipoquinas, receptores de adiponectina y marcadores de función y biogénesis mitocondriales en adipocitos blancos 3T3-L1.....	136

8.2. RELACIÓN DE FIGURAS

Figura 1.- Mapa del ADN mitocondrial humano.....	4
Figura 2.- Modelo de la maquinaria de transcripción del ADN mitocondrial.....	6
Figura 3.- Representación esquemática de los principales factores de la red transcripcional que controla la biogénesis mitocondrial.....	12
Figura 4.- Representación esquemática de los procesos de dinámica mitocondrial (a) e imagen de microscopía confocal de mitocondrias donde predomina la fusión (b) o la fisión (c).....	14
Figura 5.- Representación esquemática de la formación de radicales libres y de los principales sistemas antioxidantes.....	17
Figura 6.- Función de la adiponectina en los principales órganos y tejidos.....	27
Figura 7.- Esquema simplificado que ilustra el papel de la disfunción mitocondrial en la patogénesis de la diabetes tipo 2 en el músculo esquelético.....	35
Figura 8.- Efecto de los tratamientos hormonales sobre la masa mitocondrial de los adipocitos blancos 3T3-L1. A)B)C) Intensidad de la fluorescencia MTG D) Imágenes representativas de microscopía confocal....	94
Figura 9.- Efecto del E2 sobre los niveles de expresión de marcadores de dinámica mitocondrial y adipogénicos, adipoquinas y receptores de adiponectina en los adipocitos blancos 3T3-L1.....	96
Figura 10a.- Efecto de la progesterona y sus tratamientos combinados con flutamida o con E2 sobre los niveles de expresión de marcadores de dinámica mitocondrial (A) y adipogénicos (B) en los adipocitos 3T3-L1.....	97
Figura 10b.- Efecto de la progesterona y sus tratamientos combinados con flutamida o con E2 sobre los niveles de expresión de adipoquinas y receptores de adiponectina en los adipocitos 3T3-L1.....	98

Figura 11a.- Efecto de la testosterona y sus tratamientos combinados con flutamida o con E2 sobre los niveles de expresión de marcadores de dinámica mitocondrial (A) y adipogénicos (B) en los adipocitos 3T3-L1.....	99
Figura 11b.- Efecto de la testosterona y sus tratamientos combinados con flutamida o con E2 sobre los niveles de expresión de adipoquinas y receptores de adiponectina en los adipocitos 3T3-L1.....	100
Figura 12.- Efecto de las hormonas sexuales sobre la relación de niveles de proteína de ERa frente a ERb en adipocitos blancos 3T3-L1 e inmunoblot representativo	101
Figura 13.- Inmunoblots representativos de las determinaciones realizadas en homogenado de músculo gastrocnemius blanco	112
Figura 14.- Efecto de las hormonas sexuales sobre la masa mitocondrial y los marcadores de biogénesis en miotubos L6E9 (A) Tinción mitocondrial de miotubos L6E9 tratados con E2, Pg o T (B) Cuantificación de la fluorescencia del MTG en los miotubos L6E9. (C, D) Niveles de ARNm de Pgc1a y Tfam en miotubos L6E9.....	115
Figura 15.- Efecto de la ovariectomía y el reemplazo de estradiol sobre los niveles de ARNm de adiponectina (A) y de APPL1 (C) y sobre los niveles de proteína AdipoR1 (B) en el músculo gastrocnemius blanco. Efecto de la administración de hormonas sexuales en los niveles de ARNm de adiponectina (A), AdipoR1 (D) y APPL1 (F) en miotubos L6E9.....	116
Figura 16.- Efecto de la dieta y del tratamiento con rosiglitazona sobre la ingesta energética. (A) Diferencias entre la ingesta calórica de los grupos control y HFD medida de la semana 1 a la 15 (B) Diferencias entre la ingesta calórica de los grupos HFD y HFD+Rsg medida de la semana 13 a la 15. ..	128
Figura 17.- Efecto de la dieta y del tratamiento con rosiglitazona sobre las curvas de tolerancia a la glucosa.....	130
Figura 18.- Efecto del tratamiento con rosiglitazona sobre los niveles de expresión de adipoquinas en el TAB gonadal.....	133

Figura 19.- Efecto de la rosiglitazona sobre la masa mitocondrial en los adipocitos blancos 3T3-L1. a) Imágenes de microscopía confocal de células 3T3-L1 teñidas con MTG 0.5 μ M b) Intensidad de la fluorescencia.....135

“El final es el lugar del que partimos”

Thomas S Elliot
Poeta y dramaturgo (1888-1965)

