



**UNIVERSITAT DE LES ILLES BALEARS**

Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut

Grup de Metabolisme Energètic i Nutrició

**DIMORFISMO SEXUAL EN LA FUNCIÓN Y BIOGÉNESIS  
MITOCONDRIALES EN EL TEJIDO ADIPOSO BLANCO DE  
RATA. RESPUESTA A UNA DIETA HIPERLIPÍDICA**

Tesis doctoral para optar al grado de

**Doctora por la *Universitat de les Illes Balears***

Programa de Doctorado Interuniversitario de Nutrición Humana

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

Presentada por

**Emilia Amengual Cladera**

Palma, junio de 2012



Con el beneplácito de las Directoras

Dra. Ana M<sup>a</sup> Proenza Arenas

Profesora Titular de Universidad

Área de Bioquímica y Biología Molecular

Dept. Biologia Fonamental i Ciències de la Salut

Dra. Magdalena Gianotti Bauzà

Catedrática de Universidad

Área de Bioquímica y Biología Molecular

Dept. Biologia Fonamental i Ciències de la Salut

La interesada

Emilia Amengual Cladera



**One can resist the invasion of an army;  
one cannot resist the invasion of ideas**

Víctor Hugo (Escritor francés, 1802-1885)



## AGRADECIMIENTOS

Durante el largo camino que supone la realización de la tesis doctoral, he tenido la oportunidad de conocer a gente que ha marcado mi vida y la ha hecho más llevadera en muchas ocasiones.

En primer lugar, quiero agradecer a mis directoras de tesis, las doctoras Ana M. Proenza Arenas y Magdalena Gianotti Bauzà, su inestimable ayuda, su apoyo y todos los consejos que han hecho posible la realización de esta tesis doctoral. Al mismo tiempo, quiero expresar mi gratitud al resto de profesores del *Grup Metabolisme Energètic i Nutrició*, los doctores Isabel Lladó Sampol, Francisco J. García Palmer, Pilar Roca Salom y Jordi Oliver Oliver por haberme aconsejado y apoyado en los momentos en los que lo he necesitado.

*Thanks to Professor Patrick Schrauwen for giving me the opportunity to join his research group NUTRIM, at Maastricht University, and to Dr. Joris Hoeks for allowing me to participate actively in the experimental work. Thanks to all my colleagues and friends in Maastricht and, especially, to Sabina Paglialunga for being so generous at all levels and for introducing me to the big family they are. I will always remember my stay in Maastricht as something very special.*

No pueden faltar tampoco los que han sido mis compañeros de viaje. Mis compañeros de laboratorio y, especialmente, amigos, han hecho que esta experiencia se haya convertido en algo inolvidable. Gracias a todos, desde los más veteranos, como Pili y Tomeu – mis grandes maestros –, Roberto y Ádamo – mi pareja de baile –, hasta los más jovencitos como Cati, Gabriela, Mercedes, Dani, Marcos, Miquel y Miquel. Quiero destacar especialmente a aquellos que me habéis acompañado desde el inicio de esta aventura: Antònia N., *un dels millors resultats de la meva tesi ha estat haver-te conegut germaneta, només per això ja ha valgut la pena. Gràcies per tot el que m'has ajudat i per ser com ets. No canviïs mai!*; Jordi S., *tinc tantes anècdotes per contar i tants bons moments viscuts que no acabaria. La teva espontaneïtat i el teu humor han emplenat d'alegria i il·lusió aquest camí, fent més bones de dur les temporades difícils. Això no hagués estat el mateix sense tu, estic contenta d'haver-te conegut*; Yolanda G., gracias por ser como eres; Rocío G., te agradezco toda la

ayuda que me has brindado en este tiempo y el haberte preocupado por mí cuando lo he necesitado; Antonia M., gracias por ofrecerme tu amistad; Marilena, *crec que de tu es poden aprendre moltes coses, principalment, que la constància i la il·lusió tot ho poden. T'admiro pel que has aconseguit*; señor Dr. Miguel D. Ferrer, contigo cada día se aprende algo nuevo; Pere T., *sort que algú ha posat ordre i coherència a tot aquest desgavell. Gràcies pels teus consells y, finalmente, a Elena T., simplement, gràcies per tot.*

También querría dedicar unas líneas a todos los amigos que me habéis apoyado durante todo este tiempo. Gracias a todos, especialmente a Marina M., por compartir conmigo ilusiones y desengaños y por estar siempre ahí.

Quiero dedicarle esta tesis a toda mi familia por apoyarme incondicionalmente. A primos, sobrinos, tíos y abuelos y, especialmente, a M<sup>a</sup> Magdalena y Antoni Lluís por escucharme, animarme a continuar y ayudarme cuando lo he necesitado. Finalmente, quiero darles las gracias, muy especialmente, a mis padres Rosa y Gabriel, por ser como son. Gracias por haber creído siempre en mí y en mis posibilidades y por tener tanta paciencia. Papá, mamá: como ya he dicho en alguna ocasión, todo lo que soy os lo debo a vosotros, ya que sois el reflejo en el que mirarme. Sólo puedo añadir que OS QUIERO y que sois lo más importante de mi vida. Y, como no, Matías, gracias por haberme acompañado en este camino y por hacer el esfuerzo de entender tanta dedicación a un mundo ajeno a ti. Gracias por ser un puntal importante en mi vida y por creer en mí. TE QUIERO.

Emi



# ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS</b>	<b>III</b>
<b>RESUMEN / ABSTRACT</b>	<b>VII</b>
<b>LISTADO DE PUBLICACIONES</b>	<b>XI</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1.1. EL TEJIDO ADIPOSO BLANCO</b>	<b>3</b>
1.1.1. Clasificación y localización anatómica	3
1.1.2. Función del tejido adiposo blanco	5
1.1.2.1. Reserva y movilización de triacilgliceroles	5
1.1.2.2. Función endocrina	8
<b>1.2. LA MITOCONDRIA</b>	<b>10</b>
1.2.1. Genoma mitocondrial	10
1.2.1.1. Expresión coordinada de factores nucleares y mitocondriales	11
1.2.1.2. Transcripción del ADN mitocondrial	13
1.2.1.3. Replicación del ADN mitocondrial	13
1.2.2. Función y biogénesis mitocondriales	15
1.2.2.1. Dinámica mitocondrial	16
1.2.2.2. Disfunción mitocondrial	18
1.2.3. Dimorfismo sexual en la función y biogénesis mitocondriales	21
<b>1.3. OBESIDAD Y RESISTENCIA A LA INSULINA</b>	<b>22</b>
1.3.1. Vía de señalización de la insulina	22
1.3.2. Disfunción adipocitaria y alteración de la secreción de adipoquinas	25
1.3.3. Papel de la adiponectina en el TAB	28
1.3.4 Hipoxia e inflamación	31
<b>2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL</b>	<b>33</b>
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>41</b>

<b>4. RECAPITULACIÓN</b>	<b>45</b>
<b>5. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS</b>	<b>53</b>
<b>6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>59</b>
<b>7. ANEXO 1: MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>71</b>
<b>8. ANEXO 2: PUBLICACIONES COMPLEMENTARIAS</b>	<b>111</b>

## ABREVIATURAS

**AdipoR1 y AdipoR2:** Receptores de la adiponectina 1 y 2

**ADN:** ácido desoxirribonucleico

**ADNmt:** ADN mitocondrial

**ADNn:** ADN nuclear

**AG:** ácidos grasos

**Akt o PKB:** serina/treonina quinasa A o proteína quinasa B

**AMP:** adenosina monofosfato

**AMPK:** proteína quinasa activada por AMP

**ARN:** ácido ribonucleico

**AS160:** sustrato de la Akt de 160kDa

**CRM:** cadena respiratoria mitocondrial

**CuZNSOD:** superóxido dismutasa citosólica

**DAG:** diacilglicerol

**Drp1:** *dynamin related protein-1*

**FIS1:** proteína de fisión 1

**GLUT4:** transportador de glucosa 4

**GPx:** glutatión peroxidasa

**GSH:** glutatión reducido

**GSSH:** glutatión oxidado

**H:** promotor transcripcional de la cadena pesada del ADNmt

**HIF-1 $\alpha$ :** factor de hipoxia 1-alpha

**IR:** receptor de la insulina

**IRS1:** sustrato del receptor de la insulina 1

**JNK:** quinasa amino terminal c-jun

**L:** promotor transcripcional de la cadena ligera del ADNmt

**Mff:** factor de fisión mitocondrial

**Mfn1 y 2:** mitofusinas 1 y 2

**MiD49 y MiD51:** proteínas de dinámica mitocondrial de 49 y 51 kDa

**MnSOD:** superóxido dismutasa mitocondrial

**mTERF:** factor de terminación de la transcripción mitocondrial

**MTP18:** proteína mitocondrial de 18kDa

**NRF-1:** factor de respiración 1

**NRF-2:** factor de respiración 2

**OPA1:** atrofia óptica 1

**OXPHOS:** fosforilación oxidativa

**PAI-1:** factor activador inhibidor del plasminógeno

**PDK1:** proteína quinasa 1 dependiente de fosfatidilinositol

**PGC-1 $\alpha$ :** coactivador 1 alfa del receptor activado por proliferadores peroxisomales gamma

**PGC-1 $\beta$ :** coactivador 1 beta del receptor activado por proliferadores peroxisomales gamma

**PI3K:** fosfatidilinositol 3 quinasa

**PIP2:** fosfatidilinositol-4,5-bifosfato

**PIP3:** fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato

**PKC:** proteína quinasa C

**POLRMT:** ARN polimerasa mitocondrial

**PPAR $\gamma$ :** receptor activado por proliferadores peroxisomales gamma

**SLP-2:** stomatin like protein-2

**TAB:** tejido adiposo blanco

**TAM:** tejido adiposo marrón

**TAG:** triacilgliceroles

**TCA:** ciclo de los ácidos tricarboxílicos

**TFAM:** factor de transcripción mitocondrial A

**TFB1M y TFB2M:** factores de iniciación de la transcripción mitocondrial

**VEGF:** factor de crecimiento vascular endotelial





# **DIMORFISMO SEXUAL EN LA FUNCIÓN Y BIOGÉNESIS MITOCONDRIALES EN EL TEJIDO ADIPOSO BLANCO DE RATA. RESPUESTA A UNA DIETA HIPERLIPÍDICA**

Tesis doctoral, Emilia Amengual Cladera, *Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut, Universitat de les Illes Balears, Palma, España*

## **RESUMEN**

El tejido adiposo blanco (TAB) ha pasado de ser un simple depósito energético a ser considerado el órgano endocrino más extenso del organismo. Su capacidad para sintetizar más de 50 factores proteicos conocidos como adipoquinas, capaces de regular la sensibilidad a la insulina, la respuesta inflamatoria o la coagulación, entre otros procesos, ha llevado a replantear su función. En primer lugar, la mitocondria ha pasado a ser un orgánulo importante en el adipocito al tener un papel relevante en el proceso de adipogénesis y en la síntesis de determinadas adipoquinas, como la adiponectina y, en segundo lugar, se ha visto que la disfunción mitocondrial del TAB podría estar implicada en el desarrollo de la resistencia a la insulina.

El objetivo principal de esta tesis ha sido estudiar la influencia del sexo en las alteraciones de la función y la biogénesis mitocondriales del TAB, tanto en situación control, como en respuesta a una dieta hiperlipídica (HL) obesogénica. Se pretende, además, profundizar en la relación entre la función mitocondrial y el desarrollo de resistencia a la insulina durante el estado obeso y estudiar el papel de las hormonas sexuales en el desarrollo de las diferencias observadas entre sexos.

Los resultados obtenidos demuestran que la función y la biogénesis mitocondriales del TAB dependen del sexo, del depósito y de la dieta ingerida, y que el dimorfismo sexual se manifiesta ya a edades tempranas. Las ratas

hembra muestran un depósito retroperitoneal con una población mitocondrial más abundante pero menos diferenciada que la de los machos, al contrario de lo que ocurre en el depósito perióvarico, que presenta mitocondrias más diferenciadas que las del epididimal. La mayor diferenciación mitocondrial del depósito periovárico se traduce en una mayor expresión de la adiponectina en dicho depósito, hecho que coincide, además, con los mayores niveles séricos de adiponectina HMW (la forma más activa de esta adipoquina, con efectos insulino sensibilizantes) observados en las hembras. Todo ello, se traduce en un mejor perfil de sensibilidad a la insulina en este sexo, tanto a nivel sistémico como a nivel tisular, ya que las hembras muestran una vía de señalización a la insulina más activa que los machos. Las hormonas ováricas serían responsables, en parte, de este dimorfismo sexual, siendo el depósito gonadal más sensible a la regulación estrogénica, lo que vincula, por tanto, a los estrógenos, al mayor grado de diferenciación mitocondrial y a la expresión de adiponectina.

La dieta HL atenúa el dimorfismo sexual observado en los animales controles a nivel de la función y la biogénesis mitocondriales y desvincula la relación existente entre la función mitocondrial y la síntesis de adiponectina. Además, induce un mayor incremento del peso corporal y de la adiposidad en las ratas hembra en comparación con los machos, lo que sugiere una mayor capacidad de expansión de su tejido adiposo. Esto les permite evitar la acumulación de grasa ectópica, manteniendo una mejor sensibilidad a la insulina al evitar los efectos de la lipotoxicidad.

A pesar de que el estrés oxidativo se ha descrito como un factor subyacente al desarrollo de resistencia a la insulina inducida por una dieta HL, los resultados obtenidos tras la administración del antioxidante SkQ, sugieren que el estrés oxidativo mitocondrial no sería el principal factor asociado al desarrollo de la resistencia a la insulina ni en el TAB y ni en el músculo esquelético.





# SEXUAL DIMORPHISM IN MITOCHONDRIAL FUNCTION AND BIOGENESIS IN WHITE ADIPOSE TISSUE OF RAT. RESPONSE TO A HIGH-FAT DIET

PhD thesis, Emilia Amengual Cladera, Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut, Universitat de les Illes Balears, Palma de Mallorca, Spain

## ABSTRACT

White adipose tissue (WAT) has been considered a simple fat storage depot for a long time, but nowadays it has become recognized as a major endocrine organ in the whole body. Its capacity to synthesize over 50 protein factors known as adipokines, which are able to regulate insulin sensitivity, the inflammatory response or the coagulation process, has led to reconsider its function. Firstly, the mitochondrion has become an important organelle in the adipocyte, playing a relevant role in adipogenesis and in the synthesis of some adipokines, such as adiponectin and, secondly, it is thought that WAT mitochondrial function may be involved in the development of insulin resistance.

The main objective of this thesis was based on the study of the influence of sex on alterations in WAT mitochondrial function and biogenesis, both in the control situation and in response to a high-fat diet (HFD). Moreover, the aim was to go further into the relationship between mitochondrial function and obesity-associated insulin resistance development as well as to study the role of sex hormones in the differences found between sexes.

The results show that mitochondrial function and biogenesis in WAT depend on the sex, the depot and the diet consumed, and that sexual dimorphism is already present at an early age. Female rats show that the retroperitoneal

depot has a more abundant but less differentiated mitochondrial population than males, in contrast to what happens in the periovarian depot, which has more differentiated mitochondria than the epididymal one. Greater mitochondrial differentiation in the periovarian depot leads to the increased adiponectin expression in this depot and higher systemic HMW adiponectin levels (the more active form of this adipokine, with insulin-sensitizing effects) found in female rats. These characteristics lead to a better insulin sensitivity profile in this sex, both at a systemic and tissue level, as female rats show a more activated insulin signaling pathway than males. Ovarian hormones would be responsible, in part, for this sexual dimorphism, with the gonadal depot being more sensitive to estrogenic regulation, which links estrogens to greater mitochondrial differentiation and adiponectin expression.

HFD diminishes the sexual dimorphism found in control animals at the level of mitochondrial function and biogenesis and dissociates the existing relationship between mitochondrial function and adiponectin synthesis. Moreover, HFD leads to a greater increase in body weight and adiposity in female rats compared to males, which suggests a higher WAT expandability capacity in this sex. This allows them to avoid ectopic fat accumulation, thus maintaining better insulin sensitivity as a result of avoiding the effects of lipotoxicity.

Despite the fact that oxidative stress has been described as a factor underlying HFD-induced insulin resistance development, the results obtained after administration of the antioxidant SkQ suggest that mitochondrial oxidative stress would not be the main factor related to insulin resistance development either in WAT or in skeletal muscle.

## LISTADO DE PUBLICACIONES

Esta tesis doctoral está basada en los siguientes artículos. / *This thesis is based on these publications:*

- I. Amengual-Cladera E, Lladó I, Gianotti M, Proenza AM. *Sex differences in the effect of high-fat diet feeding on rat white adipose tissue mitochondrial function and insulin sensitivity.* Metabolism. 2012 Mar 6. [Epub ahead of print].
- II. Amengual-Cladera E, Lladó I, Proenza AM, Gianotti M. *High-fat diet feeding induces a depot-dependent response on the pro-inflammatory state and mitochondrial function of gonadal white adipose tissue.* British Journal of Nutrition. 2012. In press.
- III. Amengual-Cladera E, Lladó I, Gianotti M, Proenza AM. *Retroperitoneal white adipose tissue mitochondrial function and adiponectin expression in response to ovariectomy and 17 $\beta$ -estradiol replacement.* Steroids. 2012 May; 77(6):659-65. Epub 2012 Feb 27.
- IV. Amengual-Cladera E, Capllonch G, Lladó I, Gianotti M, Proenza AM. *Proteomic study of periovarian adipose tissue in 17 $\beta$ -estradiol treated and untreated ovariectomized rats.* Manuscrito / Manuscript.
- V. Amengual-Cladera E, Lladó I, Proenza AM, Gianotti M. *Sex dimorphism in the onset of the white adipose tissue insulin sensitivity impairment associated with age.* Manuscrito / Manuscript.
- VI. Paglialunga S, van Bree B, Bosma M, Valdecantos P, Amengual-Cladera E, Jørgensen JA, van Beurden D, den Hartog GJM, Ouwens DM, Briedé JJ, Schrauwen P, Hoeks J. *Targeting mitochondrial ROS production does not avert lipid-induced insulin resistance in muscle.* Diabetologia. 2012. In press.

VII. Amengual-Cladera E, Paglialunga S, Schrauwen P, Proenza AM, Hoeks J, Gianotti M. *SkQ effects on epididymal WAT of HF-diet-induced obese mouse*. Manuscrito / Manuscript.

Además, durante la realización de la presente tesis, la doctoranda ha colaborado en la realización de experimentos relacionados con su proyecto de tesis que han dado lugar a las publicaciones que forman parte del Anexo 2. / *Furthermore, during this thesis, the PhD student has also been involved in complementary projects that have led to the publication of the manuscripts presented in the appendix:*

VIII. Alcolea MP, Colom B, Amengual-Cladera E, Lladó I, Gianotti M, García-Palmer FJ. *Rat visceral yolk sac (VYS) and placenta mitochondrial features during the placentation period*. Mitochondrion. 2008 Dec; 8(5-6):389-95. Epub 2008 Sep 13.

IX. Gómez-Pérez Y, Amengual-Cladera E, Català-Niell A, Thomàs-Moyà E, Gianotti M, Proenza AM, Lladó I. *Gender dimorphism in high-fat-diet-induced insulin resistance in skeletal muscle of aged rats*. Cell Physiol Biochem. 2008; 22(5-6):539-48. Epub 2008 Dec 9.

X. Nadal-Casellas A, Amengual-Cladera E, Proenza AM, Lladó I, Gianotti M. *Long-term high-fat-diet feeding impairs mitochondrial biogenesis in liver of male and female rats*. Cell Physiol Biochem. 2010; 26(3):291-302. Epub 2010 Aug 24.

XI. Amengual-Cladera E, Nadal-Casellas A, Gómez-Pérez Y, Gomila I, Prieto RM, Proenza AM, Lladó I. *Phytotherapy in a rat model of hyperoxaluria: the antioxidant effects of quercetin involve serum paraoxonase 1 activation*. Exp Biol Med (Maywood). 2011 Oct 1; 236(10):1133-8. Epub 2011 Sep 5.

## **1. INTRODUCCIÓN**

---



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. EL TEJIDO ADIPOSO BLANCO

### 1.1.1. Clasificación y localización anatómica

El tejido adiposo se clasifica en base a la anatomía y a la funcionalidad de sus adipocitos, en tejido adiposo blanco (TAB) y tejido adiposo marrón (TAM). Su función como tejidos reguladores de la homeostasis energética del organismo es crucial a la vez que contrapuesta, ya que mientras el TAM es un tejido especializado en disipar energía en forma de calor a través de la termogénesis adaptativa, la función del TAB es almacenar energía en forma de triacilgliceroles (TAG) y actuar como órgano endocrino (Conde et al. 2011).

La distinta apariencia de ambos tejidos se debe a las diferencias morfológicas de las células que los constituyen. Los **adipocitos blancos** tienen una capacidad de almacenaje de TAG superior a la de los adipocitos marrones, y se caracterizan por ser células esféricas cuyo citoplasma está ocupado en su totalidad por una única vacuola lipídica, que desplaza hacia la periferia al núcleo, y por su escaso contenido citoplasmático (Ibrahim 2010). En el citoplasma pueden observarse todos los orgánulos celulares necesarios para el normal funcionamiento del adipocito, entre los que encontramos pequeñas mitocondrias. Por su parte, los **adipocitos marrones** presentan una geometría poliédrica, con numerosas vacuolas lipídicas en el citoplasma, un núcleo central esférico y un abundante número de mitocondrias (Cinti 2005).

Únicamente un tercio de las células que constituyen el TAB son adipocitos blancos, mientras que el resto está representado por fibroblastos, macrófagos, células endoteliales, monocitos y pre-adipocitos que constituyen lo que se conoce como la fracción vascular del estroma (Subramanian et al. 2009). De entre todas estas células cabe destacar el papel de los macrófagos, ya que contribuyen a la respuesta inflamatoria, y el de los pre-adipocitos, que permiten el recambio adipocitario.

El TAB se encuentra distribuido a lo largo de todo el organismo, llegando a definirse como uno de los órganos más extensos del cuerpo. En los últimos

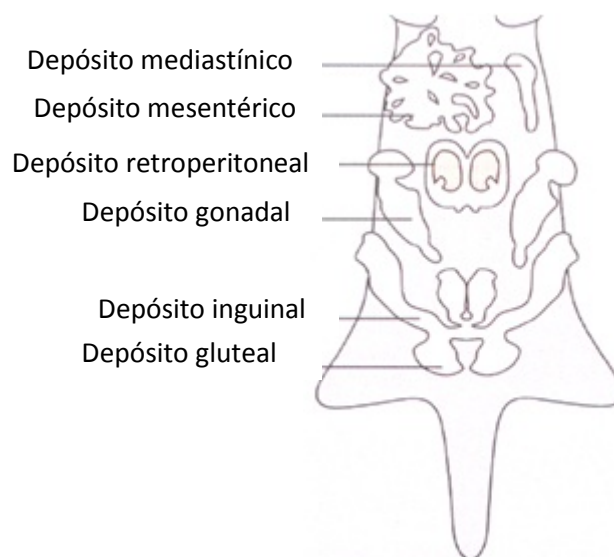
veinte años, numerosos estudios han confirmado la teoría según la cual la distribución del TAB es importante para entender la relación entre la obesidad y las alteraciones en el metabolismo glucídico y lipídico asociadas a la misma (Vague 1947; Amati et al. 2012). De hecho, el dimorfismo sexual existente en la incidencia de determinadas patologías metabólicas y cardiovasculares podría estar relacionado con la distinta distribución del TAB en machos y hembras. Concretamente, se ha visto que la acumulación de grasa en la zona central o abdominal es propia de los hombres y se conoce como “obesidad androide”, mientras que la acumulación de grasa a nivel glúteo-femoral es típica de las mujeres y se conoce como “obesidad ginoide”. La obesidad androide se asocia a una disminución de la longevidad, así como a un mayor riesgo de padecer alteraciones como la diabetes, la hiperlipidemia, la hipertensión y la aterosclerosis (Ohlson et al. 1985). Esto se ha explicado en base a que los productos de secreción del tejido adiposo visceral son liberados a la vena porta desde la cual desembocan directamente en el hígado, ejerciendo sus efectos anti-insulínicos.

Además, los adipocitos muestran diferencias metabólicas importantes en función de su localización anatómica, de modo que el tejido adiposo subcutáneo, situado justo por debajo de la piel, consta de un mayor número de células (Deveaud et al. 2004), una mayor capacidad de expansión y, en ratas, secreta una mayor cantidad de leptina que el tejido adiposo intra-abdominal. Por su parte, la grasa intra-abdominal se sitúa en el interior de la cavidad abdominal rodeando las vísceras y presenta una mayor respuesta lipolítica a las catecolaminas (Shi et al. 2007), una mayor captación de glucosa en respuesta a la insulina (Virtanen et al. 2002) y es la máxima secretora de adiponectina (Virtue et al. 2010).

Tanto el tejido adiposo subcutáneo como el intraabdominal comprenden, a su vez, distintos depósitos. En ratas, los principales depósitos grasos son el inguinal (situado a nivel subcutáneo) y el gonadal (localizado en la cavidad intraabdominal alrededor de las gónadas), los cuales representan el 1'5 y el 1% del peso corporal, respectivamente. Los depósitos intraabdominales retroperitoneal (situado en la parte inferior de los riñones) y mesentérico



(localizado entre los plexos del intestino) suponen el 0'8 y 0'7%, respectivamente (DiGirolamo et al. 1998). Por último, en base a su localización anatómica se distingue también un depósito mediastínico (situado rodeando el mediastino entre el esternón y el pericardio) y el depósito gluteal (localizado en la zona de los glúteos a nivel subcutáneo) (Figura 1).



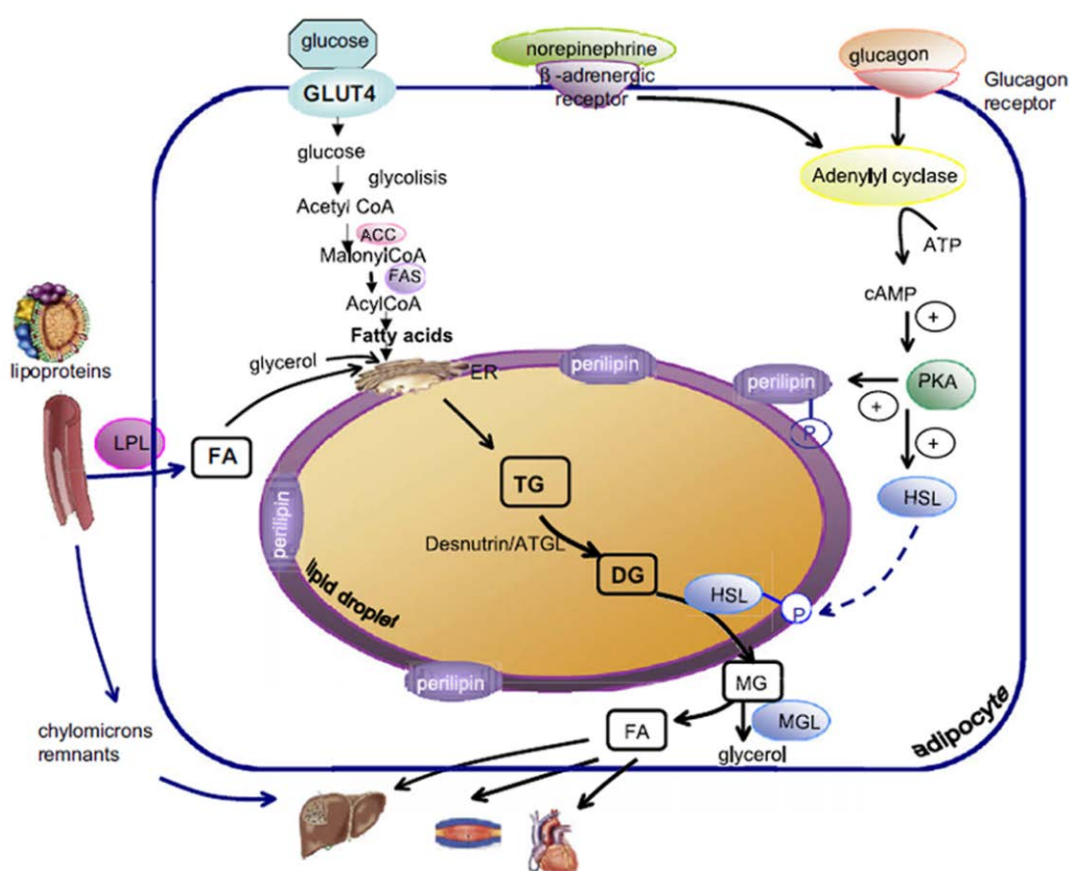
**Figura 1.** Localización anatómica de los depósitos adiposos blancos en rata y ratón. Imagen adaptada (Cinti 2000).

## 1.1.2. Función del tejido adiposo blanco

### 1.1.2.1. Reserva y movilización de triacilgliceroles

La función principal del tejido adiposo blanco consiste en gestionar la disponibilidad de ácidos grasos en diferentes escenarios metabólicos. En periodos de alimentación el TAB almacena los ácidos grasos de la dieta en forma de TAG en el interior de los adipocitos, mientras que en situaciones de demanda energética moviliza las reservas de TAG para asegurar el aporte de ácidos grasos y glicerol a tejidos como el hígado y el músculo. Los procesos de lipogénesis y lipólisis permiten al TAB mantener la homeostasis lipídica en el organismo (Lafontan 2008).

La lipogénesis es la vía metabólica a través de la cual el TAB, mediante la acción de la lipoproteína lipasa (LPL), enzima inducido por factores hormonales como la insulina, capta los ácidos grasos exógenos y endógenos mediante la hidrólisis enzimática de los TAG contenidos en los quilomicrones y en las VLDL, respectivamente (Zechner et al. 2000) (Figura 2). Ya en el interior del adipocito, se produce la re-esterificación de los ácidos grasos para ser almacenados en forma de TAG, preparados para el momento en el que las demandas energéticas del organismo requieran su movilización.

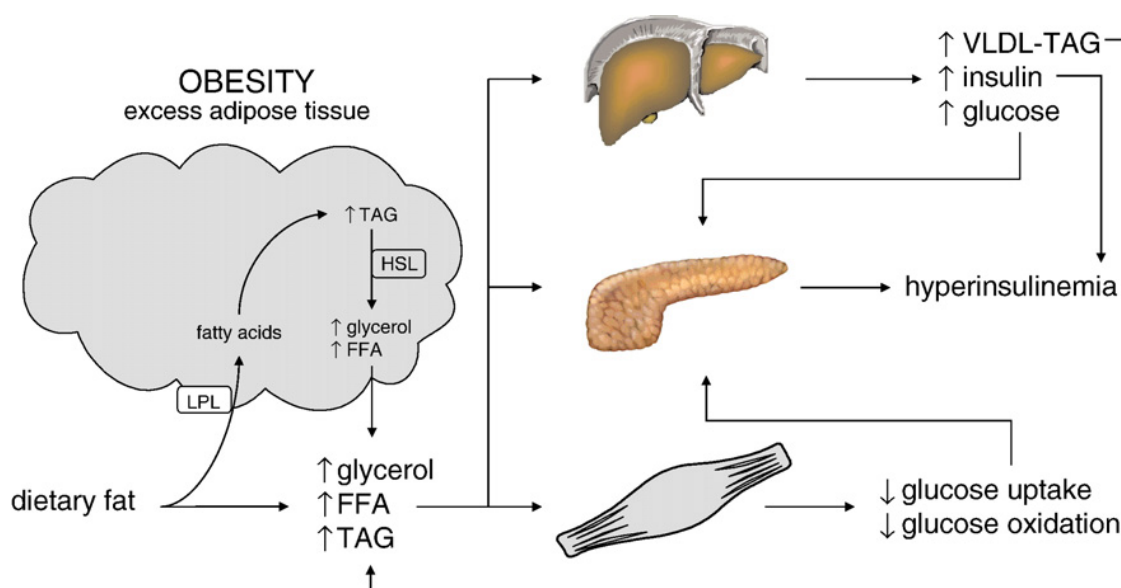


**Figura 2.** Representación esquemática de los procesos metabólicos de lipogénesis y lipólisis en el TAB (Vazquez-Vela et al. 2008).

Por otra parte, la lipólisis (Figura 2) es el proceso mediante el cual el TAB asegura la disponibilidad de ácidos grasos en tejidos como el hígado, el músculo esquelético o el corazón en situaciones de demanda energética como el ayuno o

el deporte intenso. Hormonas tales como el glucagón y las catecolaminas son inductoras de proteínas implicadas en el proceso lipolítico, como la lipasa sensible a hormonas (HSL) y la perilipina (Brasaemle et al. 2000; Lafontan et al. 2000). Los AG no esterificados (NEFAs) resultantes del catabolismo lipídico son, finalmente, liberados a la circulación uniéndose a albúmina y siendo transportados a los distintos tejidos donde serán oxidados para la obtención de energía (Arner 2005).

Cuando la ingesta calórica supera el gasto energético se induce una situación de obesidad dietética ya que se altera el balance energético del organismo. El TAB es el órgano encargado de almacenar este exceso calórico en forma de TAG en los adipocitos, manteniendo así la homeostasis del metabolismo lipídico y glucídico. De hecho, cada vez hay más evidencias de que la capacidad de expansión del TAB más que la obesidad *per se*, es el factor clave en el desarrollo de patologías como la resistencia a la insulina (Virtue et al. 2010). Durante la obesidad, los adipocitos acumulan el exceso calórico en forma de TAG, dando lugar a una hipertrofia de los mismos que acaba generando una disfunción adipocitaria si se supera la capacidad de almacenaje de dichos adipocitos. Como consecuencia de esta alteración, durante el estado postprandial, la capacidad de la insulina para inhibir la lipólisis en el TAB se ve limitada, disminuyendo la captación de AG a la vez que se ve incrementado su flujo hacia tejidos periféricos como el hígado, el músculo o el páncreas. Como mecanismo de compensación, el metabolismo oxidativo de estos tejidos aumenta en respuesta al exceso de lípidos entrantes (Savage et al. 2005), pero si la acumulación de grasa ectópica se alarga en el tiempo, la función de estos tejidos se ve alterada (Cusi 2010) y se inicia el proceso conocido como lipotoxicidad (Figura 3) (Frayn 2002; Goossens 2008). La lipotoxicidad promueve, a su vez, el desarrollo de resistencia a la insulina (Medina-Gomez et al. 2007).

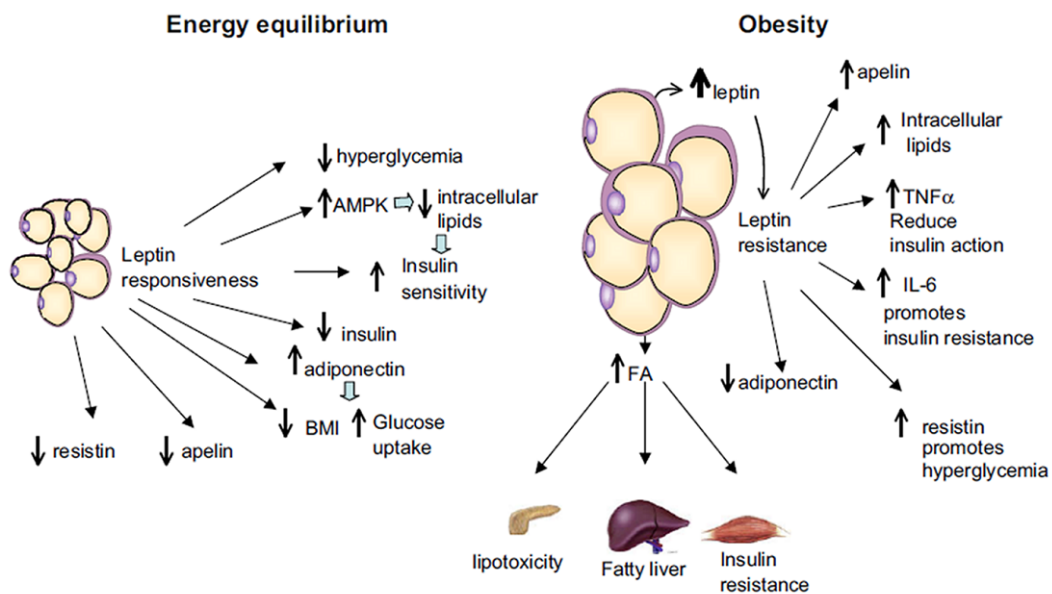


**Figura 3.** Lipotoxicidad inducida por un exceso de ácidos grasos y consecuencias derivadas de la acumulación ectópica de grasas (Goossens 2008).

### 1.1.2.2. Función endocrina

Desde el descubrimiento de la leptina en el año 1994, como hormona secretada por el tejido adiposo (Zhang et al. 1994), la concepción del TAB ha cambiado radicalmente. Este tejido ha pasado de ser considerado un simple órgano de almacenaje a mostrar una capacidad secretora que lo ha definido como uno de los órganos endocrinos más extensos del organismo (Guerre-Millo 2004). Más de 50 moléculas forman parte del listado de factores proteicos sintetizados y secretados por los adipocitos. Las moléculas secretadas por las células grasas se conocen como adipoquinas y están implicadas en la regulación del balance energético, la ingesta de alimento, la acción de la insulina y el metabolismo lipídico y glucídico. Además, también están implicadas en la regulación de la angiogénesis, la regulación de la presión y la coagulación sanguíneas, la inflamación y la función inmune y también, de manera autocrina o paracrina, participan en el desarrollo y metabolismo del propio TAB (Guerre-Millo 2004). La desregulación de su síntesis y secreción podría ser uno de los factores implicados en el inicio del proceso inflamatorio crónico asociado a la obesidad (Trayhurn et al. 2005).

El TAB parece ser el órgano que más acusa el proceso inflamatorio asociado al estado de sobrealimentación. Esta inflamación podría jugar un papel importante en el desarrollo de algunas enfermedades relacionadas con la obesidad como la diabetes de tipo 2, las afecciones cardiovasculares y otros componentes del síndrome metabólico. La disfunción adipocitaria derivada del estado obeso conduce a la desregulación de la secreción de las adipoquinas.



**Figura 4.** Comparativa de la secreción de adipoquinas en TAB en una situación de equilibrio energético y en una situación de obesidad (Vazquez-Vela et al. 2008).

Entre todas las adipoquinas secretadas por el tejido adiposo blanco destacan la leptina y la resistina ya que la alteración de sus niveles en la obesidad se ha relacionado con el desarrollo del síndrome metabólico. Especialmente importante es el papel de la adiponectina, debido a que su función pro-insulínica contribuye a mantener una buena sensibilidad a la insulina en individuos con niveles elevados de dicha hormona.

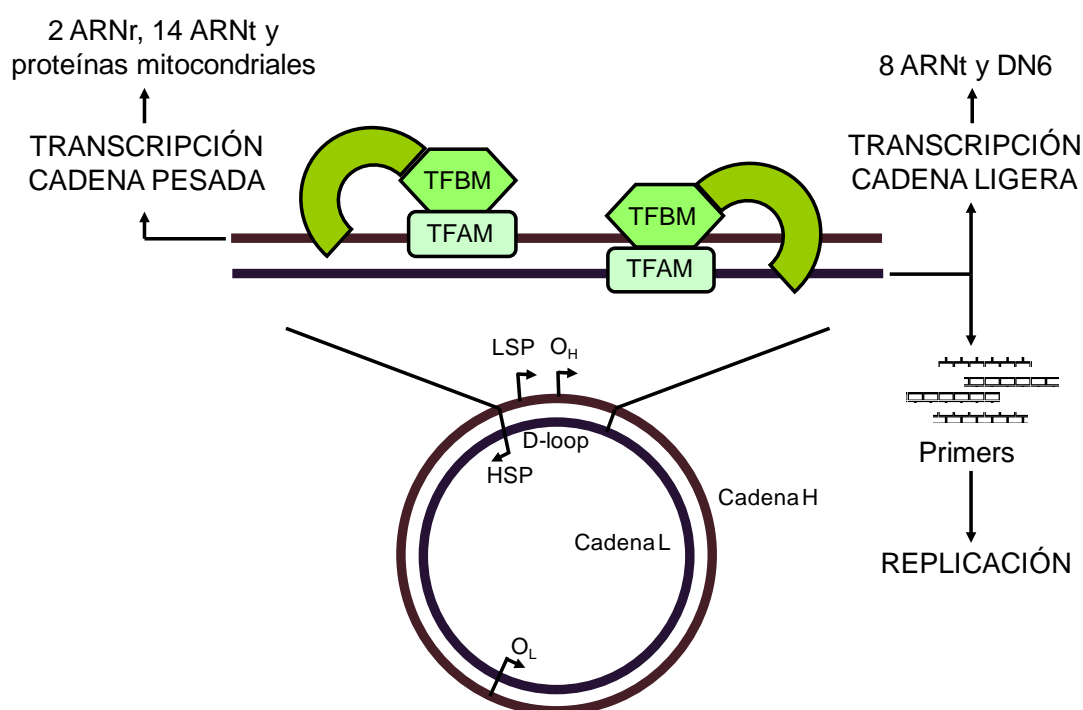
## **1.2. LA MITOCONDRIA**

Las mitocondrias son orgánulos intracelulares de doble membrana cuya función principal es la obtención de energía en forma de ATP a través de la cadena de transporte electrónico y la fosforilación oxidativa (Lee et al. 2005). Mientras el TAM, tejido altamente oxidativo y especializado en la termogénesis, consta de mitocondrias altamente funcionales con un abundante número de crestas y una elevada capacidad termogénica (Justo et al. 2005; Justo et al. 2005) el TAB muestra mitocondrias menos abundantes, de morfología alargada y crestas orientadas al azar (Cinti 2001).

### **1.2.1. Genoma mitocondrial**

Las mitocondrias poseen una dotación genética propia, constituida por una molécula de ADN circular de doble cadena de aproximadamente 16,6 kb. Treinta y siete genes integran el ADN mitocondrial (ADNmt) y codifican 22 ARNs de transferencia y 2 ARNs ribosómicos (12S y 16S) necesarios para la traducción del ADNmt (Ventura-Clapier et al. 2008), así como 13 de las 100 proteínas que constituyen la cadena respiratoria mitocondrial (CRM) de mamíferos. Concretamente, codifican distintas subunidades constituyentes del sistema de fosforilación oxidativa mitocondrial (OXPHOS): 7 subunidades de la NADH:ubiquinona oxidoreductasa (Complejo I; ND1-6, ND4L), una subunidad de la Ubiquinona:Citocromo c oxidoreductasa (Complejo III; Citocromo b), tres subunidades de la Citocromo c Oxidasa (Complejo IV; COX I-III) y dos subunidades de la H<sup>+</sup> ATP sintasa (Complejo V, ATPasa 6 y 8) (Garesse et al. 2001). El resto de subunidades del sistema OXPHOS, así como los factores implicados en el metabolismo mitocondrial, están codificados a nivel del ADN nuclear y son sintetizados en el citoplasma e importados hacia el interior mitocondrial a través de sistemas de transporte especializados (Clayton 2000). La limitación del ADNmt en cuanto a capacidad codificante requiere de la expresión coordinada de ambos genomas para regular el proceso de biogénesis mitocondrial.

La estructura típica de una molécula circular de ADNmt está formada por 2 hebras de ADN conocidas como hebra ligera (L) y hebra pesada (H). A diferencia del ADN nuclear (ADNn), el ADNmt no tiene intrones, es de herencia materna y posee un código genético no universal que difiere del correspondiente al ADNn. La única región no codificante de la molécula o región *D-loop*, contiene el origen de replicación de la cadena pesada ( $O_H$ ) y los promotores transcripcionales de ambas hebras (LSP y HSP) (Shadel et al. 1997). El origen de replicación de la cadena ligera ( $O_L$ ) está situado en otra región no codificante del ADNmt que se encuentra situada a dos tercios de distancia del  $O_H$  (Shadel et al. 1997) (Figura 5).

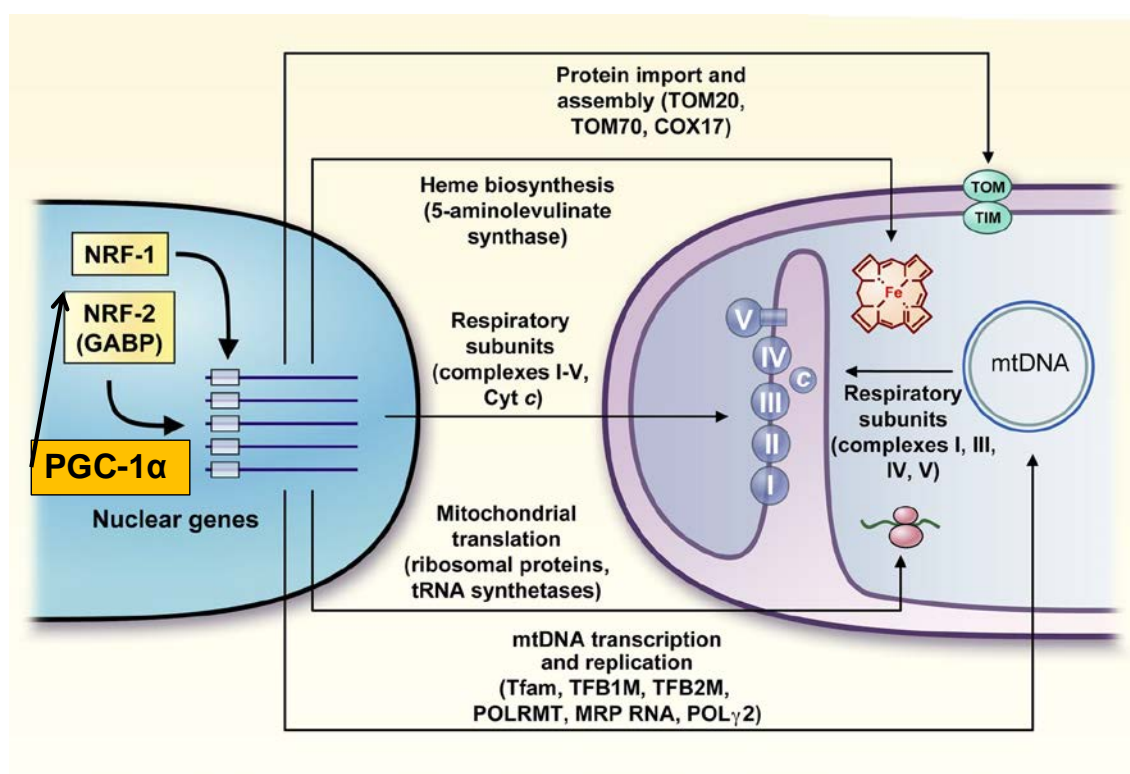


**Figura 5.** Esquema del ADNmt con los orígenes de replicación y los promotores transcripcionales. Representación del proceso de transcripción.

### 1.2.1.1. Expresión coordinada de factores nucleares y mitocondriales

Se han descrito diversas vías de señalización implicadas en la regulación de la biogénesis mitocondrial, siendo el coactivador 1 alfa del receptor activado por proliferadores peroxisomales gamma (PGC-1 $\alpha$ ) uno de los principales factores reguladores de este proceso (Puigserver et al. 2003).

El PGC-1 $\alpha$  regula la actividad de toda una serie de factores de transcripción que controlan la expresión de genes nucleares codificantes de proteínas implicadas en la función y la biogénesis mitocondriales. Entre estos factores de transcripción hay que destacar el factor de transcripción mitocondrial A (TFAM), implicado en distintos procesos mitocondriales como la replicación y la transcripción del ADNmt (Wu et al. 1999). En resumen, el PGC-1 $\alpha$  es capaz de interactuar directamente con factores de transcripción induciendo la expresión de factores nucleares como el TFAM, el cual se dirige a la mitocondria dando lugar a la activación de la biogénesis mitocondrial (Figura 6). Además, el TFAM contribuye al mantenimiento del genoma mitocondrial a través de uniones inespecíficas al ADNmt que confieren estabilidad a la molécula (Kelly et al. 2004).



**Figura 6.** Diagrama del control génico nuclear ejercido sobre las funciones mitocondriales y, en concreto, sobre los procesos de transcripción y replicación mitocondriales (adaptada de Scarpulla 2008).



### 1.2.1.2. Transcripción del ADN mitocondrial

La maquinaria de transcripción mitocondrial es muy simple comparada con la nuclear y está constituida por una ARN polimerasa inespecífica, altamente conservada en la evolución (mtRNAPol o POLRMT) y, como mínimo, por tres factores de transcripción entre los que cabe destacar el factor de transcripción específico TFAM (Fisher et al. 1985) (Figura 5).

Dada la inespecificidad de la polimerasa, ésta requiere de la unión del factor de transcripción TFAM para iniciar el proceso (Fisher et al. 1985). Dicho factor de transcripción forma parte de la familia de proteínas HMG (*high mobility group*), lo que le confiere la capacidad de unirse al ADN, torcerlo y desenrollarlo, facilitando así la actuación del resto de factores. El TFAM presenta una mayor afinidad por el promotor de la cadena ligera (L) que por el de la cadena pesada (H), de manera que bajos niveles de TFAM serán suficientes para iniciar la replicación del ADNmt. Esto se debe a que el promotor L además de promover la expresión de productos de cadena ligera, potencia la formación de moléculas de ARN que dan lugar a los cebadores necesarios para iniciar la replicación. Sin embargo, se necesitan niveles más elevados de TFAM para poner en marcha el proceso de transcripción de las proteínas mitocondriales (Dairaghi et al. 1995), ya que su afinidad por el promotor H es menor.

### 1.2.1.3. Replicación del ADN mitocondrial

Cada mitocondria contiene entre 2 y 10 copias de ADNmt (Robin et al. 1988), las cuales se replican, predominantemente, durante el final de la fase S y la fase G2 del ciclo celular (Bogenhagen et al. 1977).

Cabe destacar que el número de copias de ADNmt varía en función del tipo celular y que, normalmente, se mantiene dentro de un rango característico (Moraes 2001). Por ello, el ADNmt se usa como marcador del número de mitocondrias presentes en una muestra. En condiciones fisiológicas las moléculas de ADNmt se duplican en cada ciclo celular, generando nuevas células con la misma dotación mitocondrial (ADNmt) que la célula de origen. Sin

embargo, cuando las condiciones fisiológicas cambian, las mitocondrias sufren variaciones en el número de copias de ADNmt (Lee et al. 2005), así como en el tamaño, la forma y la capacidad funcional de dichos orgánulos en función de la demanda energética (Williams et al. 1986; Renis et al. 1989; Shay et al. 1990; Wiesner et al. 1992). Por ejemplo, se ha visto que el ejercicio crónico induce un incremento de la replicación del ADNmt que se traduce en un aumento de su expresión génica (Williams et al. 1986). Aunque no se sabe si este tipo de regulación génica del ADNmt en respuesta a situaciones fisiológicas concretas también ocurre en el TAB, sí ocurre durante el proceso de diferenciación adipocitario tanto en el tejido adiposo marrón como en el blanco (Villena et al. 2002; Shi et al. 2008), en condiciones patológicas y bajo determinados tratamientos farmacológicos. Concretamente, ratones obesos *ob/ob* muestran una alteración de la masa y funcionalidad mitocondriales en el TAB, la cual es revertida por el uso de fármacos pro-insulínicos, como las tiazolidinedionas (TZD), que favorecen la diferenciación adipocitaria a través de la activación del PPAR $\gamma$  (Wilson-Fritch et al. 2003; Wilson-Fritch et al. 2004). Del mismo modo, otros modelos experimentales de obesidad como los ratones *db/db* muestran un descenso de los niveles de ADNmt en el TAB que, de nuevo, se recuperan tras el tratamiento con TZD (Choo et al. 2006; Rong et al. 2007). Estos ejemplos confirman la relación existente entre las alteraciones en la masa y la funcionalidad mitocondriales y determinadas patologías como la diabetes, la obesidad e incluso las lipodistrofias. Cabe destacar que la reducción de los niveles de ADNmt en el TAB se acompaña de una alteración de la expresión génica de factores relacionados con la diferenciación adipocitaria (PPAR $\gamma$ ), la captación de lípidos (LPL y GLUT4) y la síntesis de determinadas adipocinas (adiponectina).

En resumen, el proceso de replicación mitocondrial, destinado a mantener una población mitocondrial constante y a evitar la acumulación de mutaciones, es un proceso muy importante para el mantenimiento de la funcionalidad del TAB. De hecho, tanto los niveles de ADNmt como su expresión génica en las mitocondrias de los adipocitos blancos podrían influir en la expresión génica nuclear a través de vías de señalización intracelulares activadas mediante las

especies reactivas de oxígeno (ROS) o debido a cambios en la actividad de la quinasa dependiente de AMP (AMPK). Además, alteraciones en la expresión génica del ADNmt pueden alterar la síntesis y secreción de adipocinas dando lugar a alteraciones a nivel sistémico que acaban generando patologías a nivel del TAB (Villarroya et al. 2009).

### **1.2.2. Función y biogénesis mitocondriales**

La biogénesis mitocondrial es un proceso complejo que implica tanto el aumento del número de mitocondrias (proliferación) como el incremento de las capacidades funcionales de dichos orgánulos (diferenciación) (Garesse et al. 2001; Fernandez-Silva et al. 2003). El proceso de biogénesis mitocondrial tiene lugar en respuesta a condiciones fisiológicas que requieren un incremento del gasto energético, como el ejercicio físico intenso (Holloszy 1967; Vina et al. 2009), la termogénesis adaptativa (Ricquier et al. 2000; Cannon et al. 2004) y, en general, procesos que requieren un incremento de las capacidades oxidativas celulares. De hecho, la capacidad termogénica del TAM se sostiene gracias a la elevada densidad mitocondrial propia de los adipocitos marrones, los cuales están normalmente desacoplados debido a la actividad que la proteína desacoplante 1 (UCP1) ejerce desde la membrana mitocondrial interna (Nicholls et al. 1986). Tanto la función mitocondrial como la actividad de las distintas isoformas de las UCPs son relevantes en otros tejidos como el músculo, el páncreas, el cerebro o el tejido adiposo blanco (Echtay 2007). En la actualidad, se sabe que la UCP2 – isoforma de las UCPs en el TAB - controla la síntesis de adiponectina en este tejido a través de la regulación de la producción de ROS (Chevillotte et al. 2007). La biogénesis mitocondrial está directamente relacionada con la diferenciación de los adipocitos blancos (Wilson-Fritch et al. 2003; Shi et al. 2008), así como con la síntesis de adiponectina (Koh et al. 2007) y con la sensibilidad a la insulina (Wilson-Fritch et al. 2003; Wilson-Fritch et al. 2004), por lo que la mitocondria ha pasado a ser un punto clave en la investigación de la resistencia a la insulina.

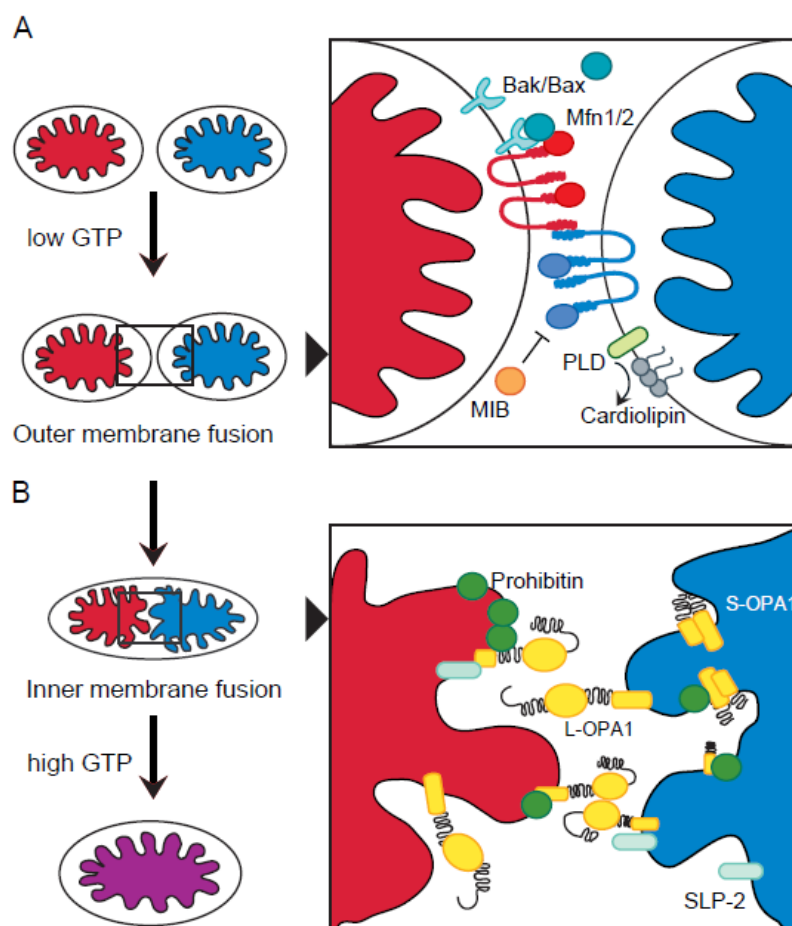
### **1.2.2.1. Dinámica mitocondrial**

El buen funcionamiento mitocondrial no depende únicamente de una correcta biogénesis mitocondrial sino también del adecuado mantenimiento de la funcionalidad de dichos orgánulos. Al contrario de lo que se creía en un principio, las mitocondrias son orgánulos altamente dinámicos (Bereiter-Hahn et al. 1994), que forman una compleja red de membranas interconectadas entre sí, encargadas de aportar metabolitos y energía esenciales para la célula (Liesa et al. 2009; Westermann 2010). En la actualidad, se sabe que las mitocondrias sufren procesos de fusión y fisión mitocondriales en respuesta a estímulos ambientales y a la demanda energética de la célula (Frazier et al. 2006; Campello et al. 2010).

#### ***Fusión mitocondrial***

La fusión es un mecanismo a través del cual la población mitocondrial mantiene su morfología, al tiempo que garantiza que la pérdida aleatoria de materiales intra-mitocondriales, tales como sustratos metabólicos o el ADNmt, sea transitoria. Para ello, la fusión permite el intercambio de ADNmt entre los orgánulos que se fusionan (Chen et al. 2005) y, además, puede actuar como mecanismo de respuesta al estrés celular (Tondera et al. 2009).

Entre las proteínas clave implicadas en la fusión mitocondrial cabe destacar las mitofusinas 1 y 2 (Mfn1 y Mfn2) (Figura 7). Se trata de proteínas con actividad GTPasa localizadas en la membrana mitocondrial externa que, coordinadas con la GTPasa de la membrana mitocondrial interna OPA1 (atrofia óptica 1), regulan el proceso de fusión de ambas membranas asegurando el mantenimiento de la compartimentación (Song et al. 2009). Cabe destacar que alteraciones en los niveles de Mfn2 en el músculo se han relacionado con una reducción del potencial de membrana mitocondrial y con el desarrollo de diabetes tipo 2 (Zorzano et al. 2010). Otras proteínas implicadas en la fusión son la prohibitina 2 y la SLP-2 (*stomatatin like protein-2*) que forman una estructura que permite el anclaje de la OPA1 en la membrana mitocondrial interna.

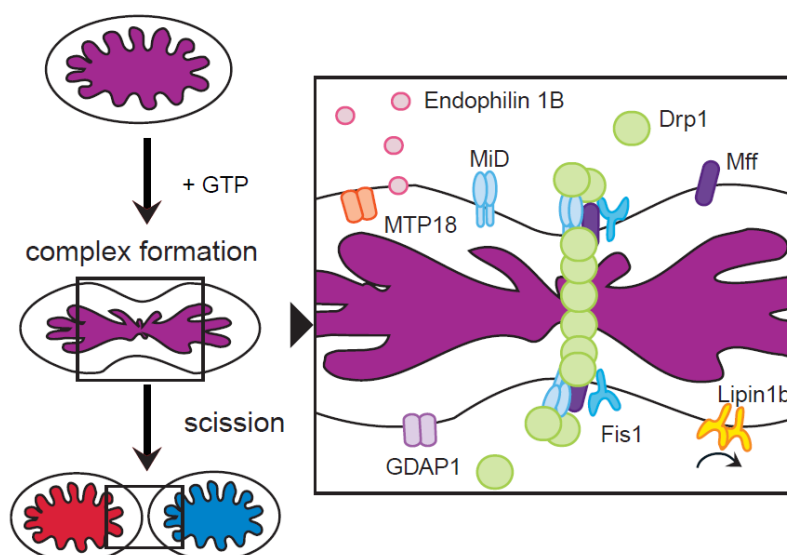


**Figura 7.** Figura esquemática del proceso de fusión mitocondrial en mamíferos y de los factores implicados (Palmer et al. 2011). MIB, proteína de unión a las mitofusinas; PLD, fosfolipasa D.

### ***Fisión mitocondrial***

La fisión mitocondrial es un proceso de escisión que ayuda a eliminar orgánulos viejos o dañados a través de un proceso de autofagia conocido como mitofagia (Kim et al. 2007). La fisión permite la eliminación selectiva de mitocondrias despolarizadas (Twig et al. 2008) durante el proceso de apoptosis (Suen et al. 2008). La proteína Drp1 (*dynamamin related protein-1*) pertenece a la familia de dinaminas GTPasas implicadas en la polimerización y constricción de membranas y es uno de los factores clave del proceso (Figura 8). Concretamente, Drp1 es un factor citosólico que se acumula en puntos concretos de la membrana mitocondrial ensamblándose en complejos multiméricos con forma de anillo (Ingeman et al. 2005). Una vez constituidas

dichas estructuras, los anillos se constriñen previa hidrólisis del GTP, facilitando la escisión de la doble membrana (Mears et al. 2011). En levaduras, el reclutamiento de este factor ocurre a través de una proteína de membrana llamada proteína de fisión 1 (Fis1). Sin embargo, estudios realizados en células de mamíferos *knockdown* para Fis1, demuestran que dicha proteína no es esencial para que Drp1 se ensamble en la membrana (Otera et al. 2010). Por el contrario, se han descrito nuevas proteínas *upstream* de Drp1, como la proteína mitocondrial de 18kDa (MTP18) (Otera et al. 2010), y *downstream*, como el factor de fisión mitocondrial (Mff) y las proteínas de dinámica mitocondrial de 49 y 51 kDa (MiD49 y MiD51) (Palmer et al. 2011), que ayudan en el reclutamiento y ensamblaje de Drp1 a la membrana mitocondrial externa.



**Figura 8.** Figura esquemática del proceso de fisión mitocondrial en mamíferos y de los factores implicados (Palmer et al. 2011). GDAP1, proteína asociada a la diferenciación inducida por gangliósidos (*Ganglioside-induced differentiation-associated protein 1*); Endophilin B1, endofilina B1; Lipin 1b, lipina 1b.

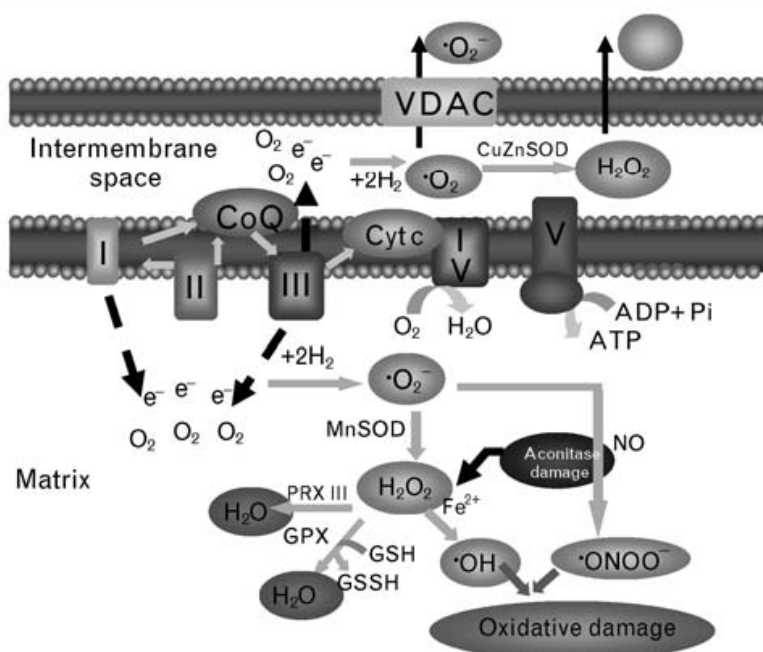
#### 1.2.2.2. Disfunción mitocondrial

Paradójicamente, a nivel mitocondrial, el oxígeno es a la vez necesario y perjudicial. El funcionamiento de la CRM implica la transferencia de electrones a través de los distintos complejos generando el gradiente protónico portador de la energía necesaria para la síntesis de ATP a nivel del complejo V (Brown 1992).

Sin embargo, en condiciones normales, hasta un 2% de los electrones que pasan a través de la CRM, principalmente a nivel de los complejos I y III, acaba reaccionando con el oxígeno molecular y generando el anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), el cual puede derivar en moléculas como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) que, a su vez, pueden generar el radical hidroxilo ( $^{\bullet}OH$ ) a través de la reacción de Fenton (Balaban et al. 2005). Además, el ión superóxido puede dar lugar a la formación de radicales libres de nitrógeno, ya que al reaccionar con el óxido nítrico (NO) forma el radical libre peroxinitrito ( $^{\bullet}ONOO^-$ ) (Civitarese et al. 2007). En la obesidad, el exceso de nutrientes acelera el metabolismo oxidativo incrementando la producción de ROS.

Para paliar el efecto deletéreo de las ROS, las células disponen de sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos encargados de eliminar las especies potencialmente peligrosas, evitando así el daño oxidativo. Entre las defensas antioxidantes enzimáticas cabe destacar las superóxido dismutasas mitocondrial (MnSOD) y citosólica (CuZnSOD), la catalasa y la glutatión peroxidasa (GPx). Las defensas no enzimáticas están constituidas principalmente por moléculas de bajo peso molecular como el ácido lipoico, el glutatión (GSH) y las vitaminas C y E. La actuación coordinada de estas defensas antioxidantes contribuye al mantenimiento del equilibrio redox (Maritim et al. 2003; Vincent et al. 2007).

Debido al funcionamiento mitocondrial, el anión superóxido generado es eliminado en la matriz mitocondrial por la MnSOD (Melov 2000) y en el espacio intermembrana y en el citosol por la CuZnSOD (Inoue et al. 2003) (Figura 9). Como resultado, se genera  $H_2O_2$  que es detoxificado y convertido en  $H_2O$  por la acción conjunta de la GPx y su cofactor, el GSH. De hecho, el GSH por sí mismo puede actuar neutralizando el efecto de los radicales libres y generando GSSH, el cual recupera su estado reducido gracias a la actividad de la glutatión reductasa y el NADPH que actúa como cofactor. Paradójicamente, el NADPH también es cofactor de la NADPH oxidasa, fuente importante de  $O_2^{\bullet-}$  (Rudich et al. 2007). Otro enzima capaz de llevar a cabo la eliminación del  $H_2O_2$  es la catalasa, la cual actúa principalmente a nivel peroxisomal.



**Figura 9.** Representación esquemática de la formación de radicales libres y de los principales sistemas antioxidantes (Civitarese et al. 2007).

El desequilibrio entre la formación de radicales libres y su eliminación por parte de las defensas antioxidantes genera lo que se conoce como 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. El daño oxidativo a nivel mitocondrial está relacionado con el desarrollo de numerosas patologías de tipo neurodegenerativo como el Parkinson y el Alzheimer (Fukui et al. 2008), diabetes tipo 2, ciertos tipos de cáncer, afecciones cardiovasculares y, en general, enfermedades asociadas al envejecimiento (Serviddio et al. 2011; Tiganis 2011). Cabe destacar que la incidencia de muchas de estas afecciones varía en función del sexo, lo cual podría estar relacionado con la mayor capacidad antioxidante observada en las hembras, la cual se traduce en un menor daño oxidativo en este género (Colom et al. 2007; Gomez-Perez et al. 2008; Bloomer et al. 2010).

No menos importante es el papel de las ROS como agentes activos en la señalización celular, siempre y cuando se encuentren en concentraciones



moderadas. De hecho, se sabe que la estimulación moderada con  $H_2O_2$  induce un incremento de la masa mitocondrial y estimula la expresión de factores implicados en su función como el PGC-1 $\alpha$  (Lee et al. 2000; Lee et al. 2001). Por tanto, en este contexto, las ROS actuarían como segundos mensajeros promoviendo la actividad de factores implicados en la biogénesis mitocondrial. Concretamente, el NRF-1 y el NRF-2 son estimulados por las ROS, dando lugar a un aumento del TFAM y de la ADN polimerasa  $\gamma$  (implicada en la replicación del ADNmt) activando así la biogénesis mitocondrial y la recuperación de los niveles de ADNmt dañados en un primer contacto con los agentes oxidantes (Suliman et al. 2003).

### **1.2.3. Dimorfismo sexual en la función y biogénesis mitocondriales**

Estudios realizados por nuestro grupo de investigación han puesto de manifiesto la existencia de un dimorfismo sexual tanto a nivel de morfología como de funcionalidad mitocondrial. Resultados obtenidos en músculo esquelético (Colom et al. 2007), hígado (Justo et al. 2005; Valle et al. 2007; Nadal-Casellas et al. 2010), tejido adiposo marrón (Justo et al. 2005; Justo et al. 2005; Valle et al. 2007; Nadal-Casellas et al. 2011), corazón (Colom et al. 2007) y cerebro (Guevara et al. 2009) indican que las ratas hembra tienen una población mitocondrial más diferenciada y con mayor capacidad oxidativa. Es más, concretamente en el TAM, se ha corroborado la existencia de mitocondrias de mayor tamaño y con una densidad de crestas superior a la de los machos (Rodríguez-Cuenca et al. 2002). Sin embargo, apenas existe información sobre el posible dimorfismo sexual existente en el TAB y, en su caso, sobre los factores responsables de dicho dimorfismo.

Las hormonas sexuales podrían ser las principales responsables de este dimorfismo, ya que se ha visto que los estrógenos estimulan la biogénesis mitocondrial. Concretamente, el  $17\beta$ -estradiol (E2) induce la replicación del ADNmt y también su transcripción, esto último a través de la inducción de la expresión del TFAM (Mattingly et al. 2008). Además, esto explicaría la distinta

incidencia entre sexos de ciertas patologías relacionadas con la disfunción mitocondrial como la diabetes tipo 2 (Wallace et al. 2004).

### **1.3. OBESIDAD Y RESISTENCIA A LA INSULINA**

Se postula que la capacidad de la glucosa para inducir una correcta estimulación de la secreción de la insulina en las células  $\beta$ -pancreáticas requiere de una correcta funcionalidad mitocondrial (Wiederkehr et al. 2012). Esto puede entenderse teniendo en cuenta que el metabolismo glucídico y lipídico convergen en la mitocondria, la cual genera la mayor parte de la energía celular en forma de ATP, mediante el acoplamiento del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA) y la fosforilación oxidativa.

Concretamente, en el TAB, los adipocitos son muy sensibles a los efectos de la insulina por lo que, en individuos sanos, pequeños aumentos en los niveles de insulina circulantes (5-15mU/L) son suficientes para disminuir de forma significativa la concentración sérica de ácidos grasos libres (AGL) (Bonadonna et al. 1990; Groop et al. 1992), siempre y cuando la vía de señalización de esta hormona mantenga su funcionalidad.

#### **1.3.1. Vía de señalización de la insulina**

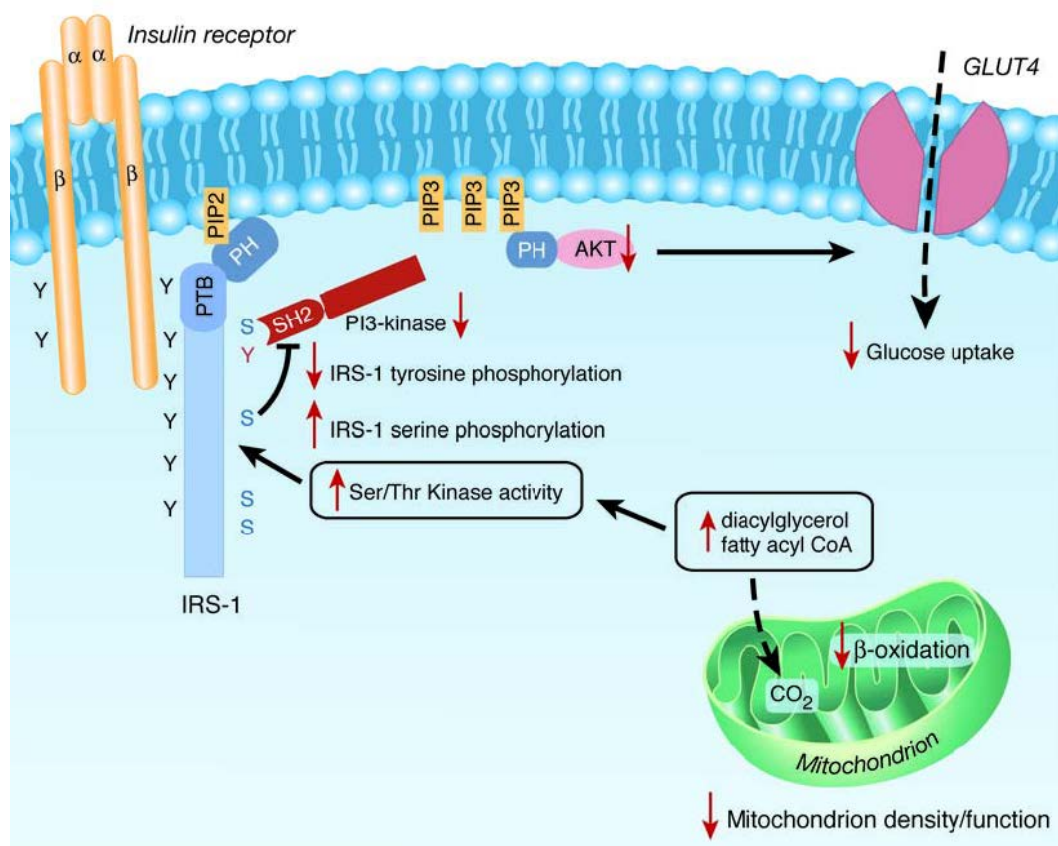
La acción de la insulina es iniciada por la unión de la hormona a su receptor (IR). Dicho receptor es una proteína integral de membrana heterotetrámera ( $\alpha 2\beta 2$ ) con actividad tirosina quinasa en los dominios beta intracelulares. La unión de la insulina al IR da lugar a la autofosforilación del receptor e inicia la cascada de señalización. Como consecuencia de ello, en el TAB, el sustrato del receptor de la insulina 1 (IRS1) se une a los residuos fosforilados del IR y es, a su vez, fosforilado. De esta manera, se propaga la cadena de fosforilaciones transmitiéndose a la fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K).

La PI3K juega un papel clave en los procesos metabólicos y mitogénicos de la insulina. Una vez activada, convierte el fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP2) en

fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3), promoviendo la aproximación de otros factores implicados en la señalización de la insulina como la proteína quinasa B (Akt/PKB) y la proteína quinasa 1 dependiente de fosfatidilinositol (PDK1) (Cheng et al. 2010).

En el TAB y en respuesta a la insulina, la activación de la Akt favorece la captación de glucosa mediante el GLUT4 (Cong et al. 1997). Concretamente, la Akt activada fosforila al sustrato de la Akt de 160kDa (AS160) el cual, una vez fosforilado, libera las vesículas que retienen el GLUT4 en el citoplasma, permitiendo su translocación a la membrana plasmática (Gaidhu et al. 2011). En dicho proceso se activan proteínas implicadas en la exocitosis y la translocación del GLUT4, favoreciendo así la captación de glucosa.

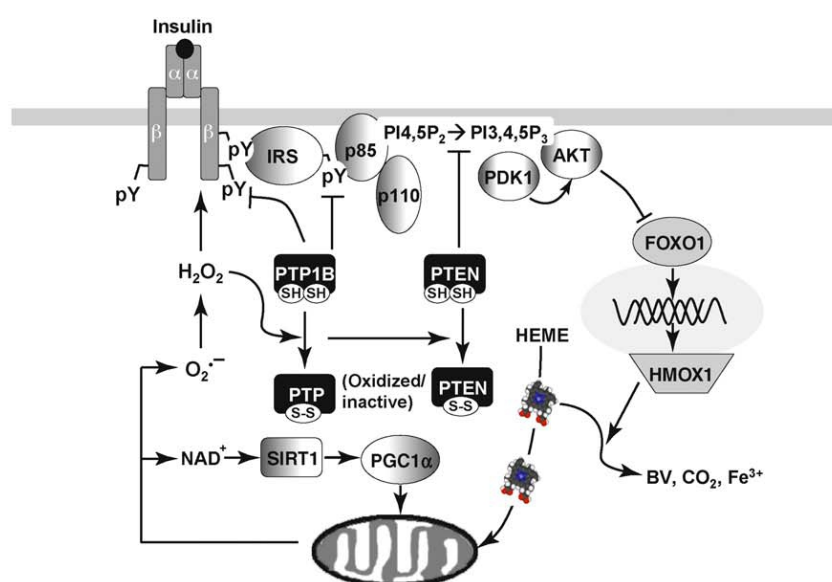
En el caso de la obesidad y las dietas ricas en grasas se produce un incremento de la disponibilidad de sustratos oxidables ligado a un aumento del funcionamiento de la cadena respiratoria mitocondrial. Como consecuencia, se produce un incremento de la producción de ROS así como de la acumulación intracelular de metabolitos derivados de los ácidos grasos, como el diacilglicerol (DAG) y el acil-CoA que pueden alterar la vía de señalización de la insulina (Figura 11). Cualquiera de estas moléculas es capaz de inducir la fosforilación de los IRS en residuos de serina (Ser<sup>307</sup>), inactivándolos e impidiendo la fosforilación de los residuos de Tyr que permiten su activación y, por tanto, la consiguiente fosforilación de sus dianas. Las quinasas sensibles a estrés como la PKC, la IKK y la JNK podrían ser las responsables de esta inhibición (Lowell et al. 2005). De este modo, queda inhibida la vía de la señalización de la insulina (PI3K/Akt).



**Figura 11.** Representación esquemática del posible mecanismo subyacente a la disfunción mitocondrial que induce resistencia a la insulina en el músculo (Lowell et al. 2005).

En el TAB, el estrés oxidativo derivado de una situación de sobrealimentación se ha relacionado con una disfunción del transporte de glucosa en los adipocitos (Rudich et al. 1998), así como con una disminución del contenido mitocondrial (Bonnard et al. 2008) y con el desarrollo de resistencia a la insulina y diabetes tipo 2 (Furukawa et al. 2004). De hecho, aunque existen estudios que demuestran que la resistencia a la insulina puede desarrollarse independientemente de la disfunción mitocondrial, la relación existente entre obesidad, disfunción mitocondrial y resistencia a la insulina es cada vez más evidente. Estudios realizados en roedores con un perfil de resistencia a la insulina (Valerio et al. 2006) y en sujetos obesos con diabetes tipo 2 (Bogacka et al. 2005), han puesto de manifiesto una disminución de los niveles de expresión del PGC-1 $\alpha$ . Además, dicha disminución concuerda con los resultados obtenidos en modelos animales con una resistencia severa a la insulina, en los que, la

AMPK y la eNOS, inductoras de la biogénesis mitocondrial en TAB (Valerio et al. 2006; Pang et al. 2008), se encuentran en niveles menores que en animales controles. Sin embargo, la relación entre la función mitocondrial y la sensibilidad a la insulina no es unidireccional, ya que la propia señalización de la insulina es necesaria para el normal funcionamiento mitocondrial (Liu et al. 2009) (Figura 12). Concretamente, la insulina induce la síntesis de proteínas mitocondriales promoviendo la capacidad oxidativa en sujetos sanos. Sin embargo, en sujetos diabéticos esta capacidad se pierde poniendo de manifiesto la compleja regulación existente entre las vías implicadas en la biogénesis mitocondrial y la señalización de la insulina (McKee et al. 1990; Stump et al. 2003).



**Figura 12.** Relación mecánica de la señalización de la insulina con la función mitocondrial (Cheng et al. 2010).

### 1.3.2. Disfunción adipocitaria y alteración de la secreción de adipocinas

Como ya se ha comentado en apartados anteriores, en una situación de equilibrio energético los adipocitos no son hipertróficos y secretan un gran número de adipocinas que ayudan, entre otras cosas, a mantener la sensibilidad a la insulina y a la leptina de los tejidos periféricos. Sin embargo, en condiciones de obesidad, los adipocitos se encuentran sobrecargados por el

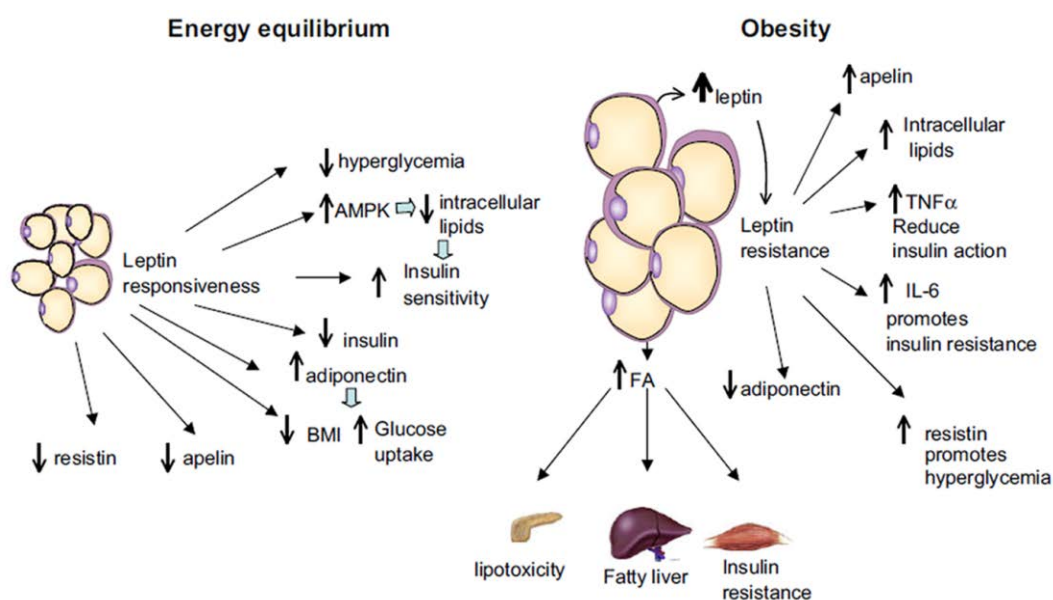
exceso de TAG que acumulan y, por tanto, se hipertrofian perdiendo funcionalidad. En estas condiciones, los adipocitos secretan elevadas cantidades de AG y adipoquinas que promueven el desarrollo de resistencia a la insulina resultando en una acumulación ectópica de grasa en tejidos como el páncreas, el hígado y el músculo esquelético (Figura 13). Aunque el número de adipoquinas secretadas por el TAB es elevado, destacan aquéllas más directamente implicadas o relacionadas con la regulación de la sensibilidad a la insulina:

La **leptina**, conocida como la hormona de la saciedad, es sintetizada en los adipocitos pero también es secretada por el estómago, la placenta y los tejidos fetales. Actúa a nivel del hipotálamo regulando la ingesta, el peso corporal y el gasto energético (Matsuzawa 2006; Wang et al. 2008). Cabe remarcar que mientras la insulina incrementa la producción de leptina por parte del TAB, ésta inhibe la secreción de insulina y su expresión génica a través de la proteína quinasa A dependiente de AMP<sub>c</sub> (PKA) y de la proteína quinasa C (PKC). De este modo, la leptina podría prevenir una hipersecreción de insulina (Tucholski et al. 2011). Los niveles de esta hormona se correlacionan con el índice de masa corporal (IMC), por lo que se encuentran incrementados en el estado obeso. De hecho, la resistencia a la leptina desarrollada en la obesidad hace que los individuos afectados no respondan a sus efectos, contribuyendo al desarrollo de la resistencia a la insulina.

Los niveles de **resistina** también se encuentran aumentados en el estado obeso y también están relacionados con el desarrollo de resistencia a la insulina en roedores. Los adipocitos no son los únicos productores de esta hormona ya que los macrófagos y otros tipos celulares también la secretan. Además, está asociada a procesos inflamatorios ya que induce y es inducida por citoquinas como el TNF- $\alpha$  y la IL-6 a través del NF $\kappa$ B (Bokarewa et al. 2005).

La **adiponectina**, secretada principalmente por los adipocitos, tiene efectos antiaterogénicos y aumenta la sensibilidad a la insulina. La estructura molecular básica de esta adipoquina es en forma de homotrímeros, los cuales pueden unirse entre ellos para formar hexámeros que, a su vez, se combinan para dar

lugar a complejos de elevado peso molecular. Estos complejos constituyen la forma más activa de la hormona y son la forma más abundante en hembras (Pajvani et al. 2003; Civitarese et al. 2006). Numerosos estudios han intentado establecer la relación entre los niveles de adiponectina y de hormonas sexuales, obteniendo resultados contrapuestos en el caso de los estrógenos y estableciendo una relación inversa entre adiponectina y testosterona (Nishizawa et al. 2002; Tworoger et al. 2007). Al contrario que las adipoquinas descritas hasta ahora, los niveles de adiponectina y sus receptores (AdipoR1 y AdipoR2) disminuyen con la obesidad y la diabetes tipo 2 (Kern et al. 2003; Civitarese et al. 2004). La resistencia a la insulina se ha relacionado con la disfunción mitocondrial (Kelley et al. 2002; Petersen et al. 2005) y con la limitación de la capacidad de expansión del TAB en una situación de abundancia energética (Ailhaud et al. 2001). Además, teniendo en cuenta que la función mitocondrial del TAB se ha relacionado con la síntesis de adiponectina (Koh et al. 2007), parece que dicha adipoquina podría ser el nexo de unión entre la resistencia a la insulina y la disfunción mitocondrial. De hecho, la adiponectina estimula la función mitocondrial en el músculo (Civitarese et al. 2006) mientras que en TAB dicho efecto todavía está por demostrar.



**Figura 13.** Comparativa de la secreción de adipoquinas en TAB en una situación de equilibrio energético y en una situación de obesidad (Vazquez-Vela et al. 2008).

Además de las ya nombradas, muchas otras adipoquinas como el inhibidor 1 del activador del plasminógeno (PAI-1), se encuentran sobreexpresadas en una situación de obesidad, lo que se ha relacionado con una mayor incidencia de problemas trombóticos al alterar el sistema de coagulación sanguínea. De igual forma, diversas citoquinas pro-inflamatorias producidas mayoritariamente por los macrófagos y en menor medida por los adipocitos, como el factor tumoral de necrosis alfa (TNF- $\alpha$ ) y las IL 1b y 6, se encuentran alteradas y se asocian con el desarrollo de la resistencia a la insulina propia del estado obeso. De hecho, el TNF- $\alpha$  se ha relacionado con una disminución de la producción de adiponectina.

### **1.3.3. Papel de la adiponectina en el TAB**

En relación a la sensibilidad tisular a la insulina, además de la propia vía de señalización de la insulina es importante tener en cuenta el efecto pro-insulínico de la adiponectina (Chiarugi et al. 2010). Este efecto es ejercido por dicha adipoquina a través de la regulación de la actividad de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK). Por definición, la adiponectina es una hormona cuyos niveles se han relacionado con un incremento de la sensibilidad a la insulina, especialmente en tejidos como el hígado y el músculo. En dichos tejidos, la adiponectina modula el metabolismo lipídico, induciendo un incremento en la oxidación de ácidos grasos y reduciendo el contenido en TAG (Kadowaki and Yamauchi, 2005). Además, en el músculo, la capacidad de la adiponectina para inducir la biogénesis mitocondrial (Civitarese et al. 2004) podría ser también otro factor a tener en cuenta. Sin embargo, en la actualidad, todavía se tiene muy poca información sobre el funcionamiento y los efectos específicos de esta hormona sobre el TAB.

Estudios realizados en sistemas *in vitro* e *in vivo* sugieren que la adiponectina ejerce su función anti-diabética, anti-aterogénica y anti-inflamatoria a través de dos vías de señalización mayoritarias, iniciadas por la unión de la hormona a sus receptores, AdipoR1 y AdipoR2 (Yamauchi et al. 2003). Se trata de proteínas integrales de membrana cuya estructura se asemeja a la de los receptores acoplados a proteínas G, los cuales constan de siete dominios transmembrana.

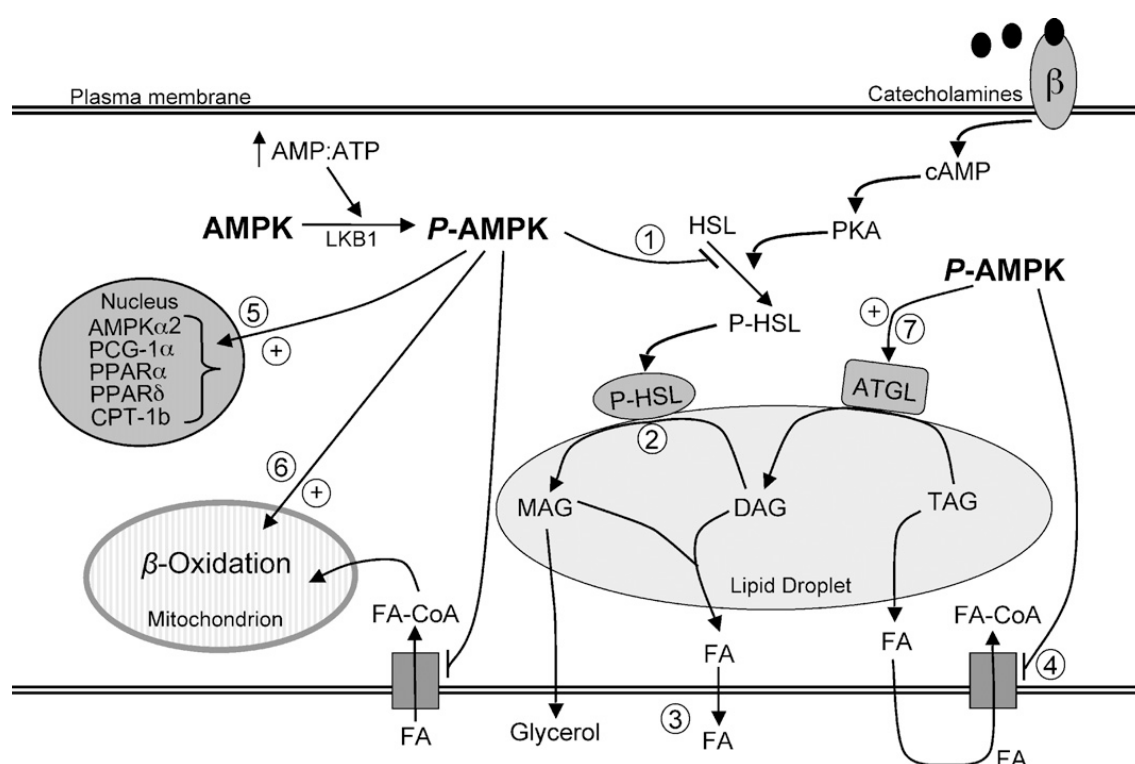


Sin embargo, los AdipoR poseen además un dominio N-terminal intracelular y un dominio C-terminal extracelular que los diferencia de los anteriores. Se cree que la interacción de la adiponectina con sus receptores desencadena los efectos anti-diabéticos a través de la activación de la AMPK.

La AMPK es un enzima heterotrimérico que actúa como *sensor de combustible* monitorizando los cambios en el estado energético de la célula. Se activa alostéricamente, en respuesta a valores elevados del ratio AMP/ATP, y por fosforilación de la treonina 172, por parte de la LKB1, y activa procesos catabólicos destinados a proporcionar energía en forma de ATP (Hardie 2007). La AMPK está formada por una subunidad catalítica ( $\alpha$ ) y dos subunidades reguladoras ( $\beta$  y  $\gamma$ ), de las cuales en mamíferos existen varias isoformas ( $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\gamma$ 1- $\gamma$ 3) (Hardie et al. 1997). Las diferentes isoformas se combinan entre ellas formando hasta 12 complejos diferentes que permiten a la AMPK mostrar una cierta actividad específica de tejido (Cheung et al. 2000). De hecho, mientras en el músculo la subunidad catalítica de la AMPK está constituida por la isoforma  $\alpha$ 2, en el hígado pueden encontrarse tanto la isoforma  $\alpha$ 1 como la  $\alpha$ 2 (Stapleton et al. 1996; Woods et al. 1996). Por el contrario, en el TAB la subunidad catalítica  $\alpha$ 1 es la isoforma predominante y la principal responsable de la actividad AMPK en este tejido (Lihn et al. 2004; Daval et al. 2005). Posiblemente, este hecho explique el diferente efecto de la AMPK en el TAB en comparación con el músculo.

En general, la actividad de la AMPK supone la activación de la oxidación de ácidos grasos en tejidos periféricos (Long et al. 2006; Hardie 2007). Sin embargo, en el TAB, el efecto de la AMPK es dependiente del tiempo. Concretamente, la inducción aguda de la actividad AMPK inhibe la lipólisis, a nivel de la HSL, y reduce la captación y la oxidación de glucosa y AGs (Gaidhu et al. 2009) (Figura 14). De este modo, el TAB evitaría el gasto de ATP en condiciones de estrés celular y reservaría los AGs para su uso por parte de tejidos que dependen de su oxidación para la obtención de energía, como el músculo y el hígado. Por el contrario, la inducción crónica de dicho enzima tiene no sólo un potente efecto anti-lipogénico, que se materializa a través del incremento de la expresión de factores tales como el PGC-1 $\alpha$  y los PPARs  $\alpha$  y  $\delta$ ,

y mediante la supresión de la captación de AGs, sino que promueve su oxidación. Además, induce un incremento de la expresión de la ATGL que, combinada con la inhibición inicial de la HSL, implica una inducción parcial de la lipólisis (Gaidhu et al. 2009). En general, esto permite una disminución de la masa del TAB que estaría ligada a una mejora de la sensibilidad a la insulina. Además, el catabolismo incompleto de los TG es un mecanismo mediante el cual el TAB evitaría la liberación excesiva de AG que, al no ser oxidados ni endógena ni exógenamente, volverían a ser re-esterificados y almacenados en el TAB, creando un ciclo fútil de energía (Guan et al. 2002; Gauthier et al. 2008).



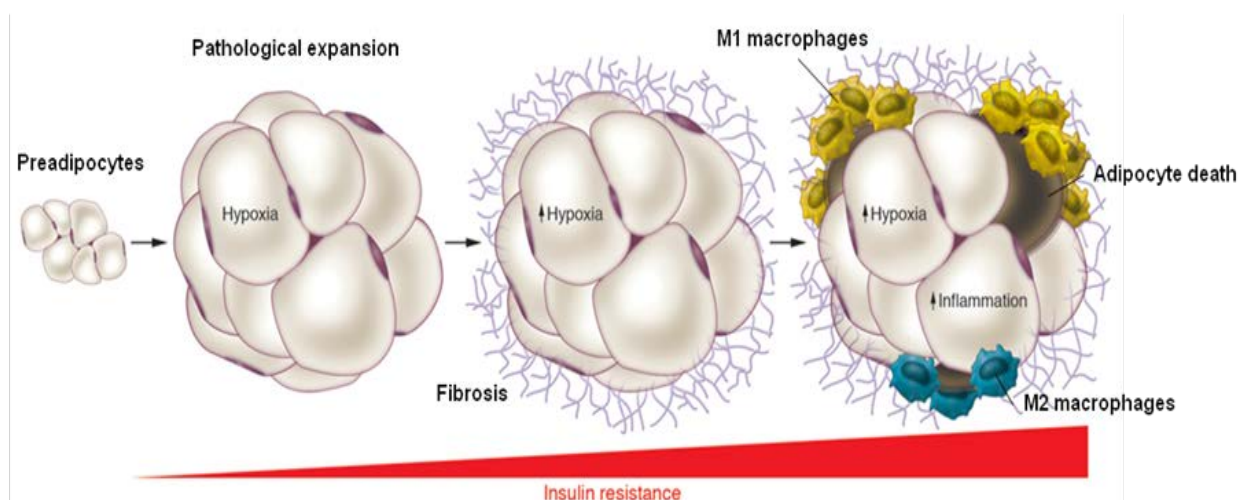
**Figura 14. Regulación del metabolismo lipídico por parte de la AMPK.** La activación aguda de la AMPK inhibe la actividad de la HSL (1), previniendo la hidrólisis de diacilglicerol (2) y la consiguiente liberación de ácidos grasos y glicerol (3). Tanto la activación aguda como crónica de la AMPK inhibe la captación de AG (4) denotando un importante efecto anti-lipogénico. La activación crónica de la AMPK activa la expresión de PGC-1 $\alpha$ , PPAR $\alpha$ , PPAR $\delta$  y CPT1b (5) incrementando la disponibilidad intracelular de AG para la  $\beta$ -oxidación (6). La activación de la ATGL (7) durante la activación crónica de la AMPK supone la hidrólisis de un AG de los TAG.

En realidad, todavía quedan muchas incógnitas por descubrir en relación al papel de la AMPK en TAB. De hecho, la precisa regulación de la lipólisis por parte de dicho enzima ha llevado a obtener resultados contrapuestos, existiendo estudios tanto a favor

(Anthony et al. 2009) como en contra (Koh et al. 2007) del efecto anti-lipolítico de este enzima. En cualquier caso, la adiponectina a través de esta vía también regula la actividad de enzimas como la acetil-CoA carboxilasa (ACC) y de factores como el PPAR $\alpha$ , implicados en la oxidación de ácidos grasos.

#### **1.3.4. Hipoxia e inflamación**

Debido a que la vascularización del TAB es escasa, la formación de nuevos vasos sanguíneos, proceso conocido como angiogénesis, es necesaria para permitir una correcta expansión del tejido adiposo en la obesidad (Rupnick et al. 2002; Fleischmann et al. 2005). De hecho, la hipoxia es una de las consecuencias más relevantes del incremento de la masa grasa y, a su vez, actúa de estímulo desencadenando la expresión de genes codificantes de factores angiogénicos, promoviendo la formación de nuevos vasos (Lolmede et al. 2003). Se sabe que la hipertrofia lleva a los adipocitos de sujetos obesos a alcanzar diámetros de entre 150-200  $\mu\text{m}$ , mientras que la capacidad de difusión normal del  $\text{O}_2$  oscila entre las 100-200  $\mu\text{m}$  (Brahimi-Horn et al. 2007). Sin embargo, adipocitos pequeños también sufren las consecuencias de la hipoxia, de modo que la deficiencia del sistema vascular parece ser, hoy por hoy, la principal responsable de dicha hipoxia. De hecho, el factor de hipoxia 1-alfa (HIF-1 $\alpha$ ) es el principal inductor de las adaptaciones a la hipoxia, promoviendo la expresión de factores como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y el inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1), implicados en la formación de nuevos vasos sanguíneos en el tejido para asegurar el aporte de oxígeno necesario. Además, la hipoxia induce la fibrosis del TAB, causando la disfunción del tejido (Halberg et al. 2009) y del transporte de glucosa en los adipocitos (Trayhurn et al. 2008) (Figura 15).



**Figura 15.** Proceso por el cual la inflamación se relaciona con el desarrollo de la resistencia a la insulina (adaptada de Sun et al. 2011).

En la actualidad, existen evidencias que demuestran que la obesidad está asociada a un estado de inflamación crónica del tejido adiposo, que se acompaña tanto de un incremento de la infiltración de macrófagos (Weisberg et al. 2003), como de un aumento de los niveles plasmáticos de citoquinas inflamatorias (Bullo et al. 2003). De hecho, la propia hipoxia estaría relacionada con el inicio de un estado pro-inflamatorio (Trayhurn et al. 2004; Trayhurn et al. 2008) y se vería acentuada por la desregulación de la secreción de adipocinas que contribuiría a incrementar la señalización proinflamatoria (IL6, TNF- $\alpha$ , leptina, etc). Se ha visto que dicha inflamación aumenta la lipólisis y reduce la esterificación de los AGs en los adipocitos, dando lugar a un incremento de los AGs circulantes y favoreciendo su acumulación a nivel ectópico (Ye 2011). Además, la hipoadiponectinemia característica del estado obeso junto con los derivados de los AGs inducen, en el TAB, la inhibición del IRS1 a través de la fosforilación por parte de las quinasas de serina (Ye 2011). Por ello, tanto el incremento de citoquinas pro-inflamatorias como la lipotoxicidad estarían implicados en el desarrollo de la resistencia a la insulina.

## **2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL**

---



## 2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL

El trabajo realizado en esta tesis doctoral forma parte de una línea de investigación más amplia que pretende profundizar en los mecanismos moleculares implicados en el dimorfismo sexual existente en la función y biogénesis mitocondriales. Concretamente, estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación han puesto de manifiesto la existencia de un claro dimorfismo sexual en la función y biogénesis mitocondriales de distintos tejidos, tanto en condiciones de alimentación estándar como en respuesta a una dieta HL. De hecho, en hígado (Justo et al. 2005; Nadal-Casellas et al. 2010), músculo esquelético (Colom et al. 2007), tejido adiposo marrón (Justo et al. 2005; Justo et al. 2005; Nadal-Casellas et al. 2011), corazón (Colom et al. 2007) y cerebro (Guevara et al. 2009), las ratas hembra muestran una población mitocondrial más funcional, con una mayor capacidad oxidativa. Además, aunque la producción de ROS sea mayor en las hembras, éstas muestran una mejor defensa antioxidante en respuesta a dietas obesogénicas, por lo que presentan un menor daño oxidativo en comparación con los machos. Sin embargo, el estudio del dimorfismo sexual en el TAB no ha sido planteado hasta ahora, a pesar de que el estrés oxidativo se ha relacionado con el desarrollo de la obesidad y de las patologías asociadas (Furukawa et al. 2004; Rebolledo et al. 2008).

Dados los avances realizados en los últimos años en el conocimiento de la función del TAB, este tejido ha pasado de ser considerado como un mero depósito de grasa a erigirse como el órgano endocrino más extenso del organismo, con capacidad para sintetizar y secretar un gran número de adipoquinas, implicadas en la regulación del metabolismo energético a nivel global (Conde et al. 2011). Es más, la síntesis de adiponectina, una de las principales adipoquinas secretadas por el TAB y que tiene efectos pro-insulínicos (Chiarugi et al. 2010), ha sido relacionada directamente con la función mitocondrial de dicho tejido (Koh et al. 2007), de modo que una disfunción mitocondrial podría conducir a una alteración de la síntesis de adiponectina en el TAB. La función mitocondrial del TAB se ha visto subestimada

durante mucho tiempo y, en este sentido, el protagonismo ha recaído en otro tejido adiposo, el marrón, en el que se han centrado los estudios de función mitocondrial en roedores, debido a la elevada cantidad de mitocondrias que presenta y a su importante papel en la termogénesis adaptativa (Rodríguez-Cuenca et al. 2002; Cannon et al. 2004; Rodríguez-Cuenca et al. 2007; Nadal-Casellas et al. 2011). Por tanto, poco se sabe de la importancia de la función y biogénesis mitocondriales del TAB y de su relación con la sensibilidad a la insulina a nivel tisular.

La obesidad intraabdominal, se ha asociado a un incremento de la resistencia a la insulina. Este proceso se explicaría principalmente en base a los efectos adversos ligados a este tipo de grasa (Bjorntorp 1991; Wajchenberg 2000), la cual vierte sus productos de secreción directamente en la vena porta a través de la cual alcanzan el hígado. Por este motivo, en esta tesis doctoral decidimos focalizar nuestro estudio en el análisis de dos depósitos intra-abdominales como son el retroperitoneal y el gonadal, bajo la hipótesis de que éste último estaría más influenciado por el efecto de las hormonas sexuales debido a su localización alrededor de las gónadas.

El objetivo general de la presente tesis doctoral ha sido investigar si existe un dimorfismo sexual en la función y biogénesis mitocondriales del TAB, tanto en situación control, como en respuesta a una dieta hiperlipídica. Además, se ha profundizado en la relación existente entre la función mitocondrial y el desarrollo de resistencia a la insulina en dicho tejido, así como en el papel de las hormonas sexuales en el desarrollo de las diferencias observadas entre sexos. Este objetivo general se desglosa en 4 objetivos específicos que se detallan a continuación.

El **primer objetivo** consistió en estudiar la función y biogénesis mitocondriales del TAB en ratas de ambos sexos, así como en profundizar en su relación con la síntesis de adiponectina y el estado pro-inflamatorio propio de la obesidad. Para ello, se usaron ratas Wistar de ambos sexos, de 9 meses de edad, que habían sido alimentadas durante 26 semanas con una dieta estándar (animales controles) o con una dieta hiperlipídica (HL), conocida como dieta de cafetería



(animales obesos). La dieta de cafetería es una dieta altamente palatable que induce, en animales, una obesidad dietética de características semejantes a la observada en humanos (Milagro et al. 2006). Se determinaron los niveles de ARNm y circulantes de la adiponectina, los niveles de los principales marcadores de función mitocondrial y de factores pro-inflamatorios, así como de marcadores de hipoxia y de infiltración de macrófagos. Los resultados obtenidos se detallan en los **Manuscritos I y II** de la presente tesis doctoral.

En base a los resultados obtenidos en la consecución del primer objetivo, se observa un claro dimorfismo sexual en la biogénesis mitocondrial del TAB, que supone diferencias tanto en el número como en el grado de diferenciación de las mitocondrias de machos y hembras, así como en los niveles circulantes de adiponectina y que podrían atribuirse a las hormonas sexuales. El cese de la función ovárica durante la menopausia o en modelos experimentales de ratas ovariectomizadas pone de manifiesto la importancia de la función de las hormonas sexuales en la distribución de la grasa corporal, la cual pasa de acumularse mayoritariamente en la región subcutánea a hacerlo en la región abdominal, contribuyendo al desarrollo de resistencia a la insulina (Mayes et al. 2004; Gallagher et al. 2011). Además, el cese de la actividad de las hormonas ováricas conlleva un incremento de la masa grasa, que puede implicar una disfunción adipocitaria asociada a una desregulación de la síntesis de adipoquinas. Por tanto, el **segundo objetivo** de la presente tesis pretendía profundizar en el papel de las hormonas ováricas en el dimorfismo sexual observado a nivel de función y biogénesis mitocondriales del TAB, así como en la expresión de la adiponectina. Para ello, utilizamos ratas Wistar ovariectomizadas a las 5 semanas de edad y sus correspondientes controles. Las ratas ovariectomizadas se dividieron en dos grupos: uno tratado con 17 $\beta$ -estradiol (E2, 10 $\mu$ g/kg/48h) y otro tratado con el vehículo (aceite de maíz) durante las 4 semanas anteriores al sacrificio. La administración de una dosis fisiológica de E2 permite investigar qué efectos son consecuencia directa de esta hormona. Para alcanzar el objetivo propuesto se determinaron parámetros como el peso corporal, el índice de adiposidad, los marcadores séricos de sensibilidad a la insulina y los niveles de las principales proteínas implicadas en

la función mitocondrial y en las defensas antioxidantes. Además, en el caso del depósito gonadal, dichas determinaciones se completaron con un estudio de proteómica que pretendía dar una visión más amplia y exhaustiva de los cambios que implicaba la ovariectomía y la posterior suplementación con E2 en la dotación tisular de proteínas. Los resultados obtenidos se recogen en los **Manuscritos III y IV**.

Los resultados derivados de la consecución del primer objetivo ponen de manifiesto que, a los 9 meses de edad, las hembras tienen un mejor perfil de sensibilidad a la insulina, una mayor capacidad oxidativa y una mejor protección frente al estrés oxidativo que los machos de la misma edad. Este hecho podría estar relacionado con un mayor efecto deletéreo de la edad en los machos y podría reflejarse en una mayor resistencia a la insulina a nivel tisular. Por ello, como **tercer objetivo** nos planteamos estudiar la evolución con la edad de la sensibilidad a la insulina a nivel de TAB. Para llevar a cabo este objetivo, se utilizaron ratas Wistar de ambos sexos de 3, 9 y 18 meses de edad con el fin de analizar la posible alteración de las vías de señalización de la insulina y de la adiponectina en el TAB, así como dilucidar la posible existencia de un dimorfismo sexual. Se realizaron curvas de tolerancia a la glucosa y se determinaron los niveles circulantes de la glucosa, la insulina y la adiponectina. Además, se cuantificaron los niveles de las principales proteínas implicadas en las vías de señalización de la insulina y de la adiponectina. Los resultados obtenidos se recogen en el **Manuscrito V**.

Durante el transcurso de la tesis doctoral, la doctoranda realizó una estancia de investigación de 3 meses en la Universidad de Maastricht, iniciando una colaboración con el grupo de investigación *Nutrition, Toxicology and Metabolism (NUTRIM)* dirigido por el Dr. Patrick Schrauwen. Durante esta estancia participó de forma activa en un estudio cuyo objetivo principal ha pasado a constituir el **cuarto objetivo** de esta tesis doctoral. Concretamente, se pretendía determinar si la administración del antioxidante SkQ o ión de Skulachev (Skulachev et al. 2009), cuya diana específica es la mitocondria, conseguía disminuir los efectos deletéreos del incremento en la producción de

ROS asociado a la alimentación con una dieta alta en grasas y sacarosa (HLS), en el músculo esquelético y el TAB gonadal de ratón, preservando así la función mitocondrial y la sensibilidad a la insulina de dichos tejidos. Para la consecución de este objetivo, se utilizaron ratones macho C57Bl/6 de ocho semanas de edad, alimentados durante 16 semanas con una dieta con alto o bajo contenido en grasa, en función del grupo experimental. Uno de los grupos de animales alimentados con dieta HLS fue además suplementado con el antioxidante SkQ, que se suministró disuelto en el agua de bebida, el cual interviene en la neutralización de los ROS producidos a nivel de los complejos I y III de la cadena de transporte electrónico mitocondrial (Antonenko et al. 2008). Los antecedentes que sostienen este planteamiento experimental se basan en estudios que demuestran que, en condiciones de resistencia a la insulina, la producción mitocondrial de ROS y, por consiguiente, el estrés oxidativo, se encuentran incrementados en tejidos como el músculo (Anderson et al. 2009; Lefort et al. 2010), el hígado y el páncreas (Nishikawa et al. 2007) y el tejido adiposo blanco (Furukawa et al. 2004). Por ello, las ROS se han descrito como posibles inductoras de resistencia a la insulina, favoreciendo así el desarrollo de la diabetes tipo 2. La disfunción mitocondrial, como hemos indicado previamente, es otro de los factores implicados en la resistencia a la insulina y, además, es la principal fuente de ROS. Para ver el efecto del tratamiento con SkQ en el músculo esquelético, se determinaron la respiración mitocondrial, la producción de ROS, el daño oxidativo, los niveles proteicos del sistema OXPHOS y de marcadores de la sensibilidad a la insulina, así como diversas actividades enzimáticas. En el TAB se realizó un estudio de expresión génica de los principales marcadores de función y biogénesis mitocondriales, de enzimas antioxidantes y de la vía de señalización de la insulina. Los resultados obtenidos en este estudio están recogidos en los **Manuscritos VI y VII**.

La metodología para llevar a cabo todas las determinaciones expuestas en este apartado se encuentra detallada en el anexo 1 de Materiales y Métodos.

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 (*Ciberobn*) - *Fisiopatología de la obesidad y la nutrición* del Instituto de Salud Carlos III. 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) y por el Fondo de Investigaciones Sanitarias (PI060293) del Gobierno Español.

### **3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

---



## LISTADO DE PUBLICACIONES

Esta tesis doctoral está basada en los siguientes artículos. / *This thesis is based on these publications:*

- I. Amengual-Cladera E, Lladó I, Gianotti M, Proenza AM. *Sex differences in the effect of high-fat diet feeding on rat white adipose tissue mitochondrial function and insulin sensitivity.* Metabolism. 2012 Mar 6. [Epub ahead of print].
- II. Amengual-Cladera E, Lladó I, Proenza AM, Gianotti M. *High-fat diet feeding induces a depot-dependent response on the pro-inflammatory state and mitochondrial function of gonadal white adipose tissue.* British Journal of Nutrition. 2012. In press.
- III. Amengual-Cladera E, Lladó I, Gianotti M, Proenza AM. *Retroperitoneal white adipose tissue mitochondrial function and adiponectin expression in response to ovariectomy and 17 $\beta$ -estradiol replacement.* Steroids. 2012 May; 77(6):659-65. Epub 2012 Feb 27.
- IV. Amengual-Cladera E, Capllonch G, Lladó I, Gianotti M, Proenza AM. *Proteomic study of periovarian adipose tissue in 17 $\beta$ -estradiol treated and untreated ovariectomized rats.* Manuscrito / Manuscript.
- V. Amengual-Cladera E, Lladó I, Proenza AM, Gianotti M. *Sex dimorphism in the onset of the white adipose tissue insulin sensitivity impairment associated with age.* Manuscrito / Manuscript.
- VI. Paglialunga S, van Bree B, Bosma M, Valdecantos P, Amengual-Cladera E, Jørgensen JA, van Beurden D, den Hartog GJM, Ouwens DM, Briedé JJ, Schrauwen P, Hoeks J. *Targeting mitochondrial ROS production does not avert lipid-induced insulin resistance in muscle.* Diabetologia. 2012. In press.

VII. Amengual-Cladera E, Paglialunga S, Schrauwen P, Proenza AM, Hoeks J, Gianotti M. *SkQ effects on epididymal WAT of HF-diet-induced obese mouse*. Manuscrito / Manuscript.



## **4. RECAPITULACIÓN**

---



#### 4. RECAPITULACIÓN

El eje principal de la presente tesis doctoral ha sido el estudio de la función y la biogénesis mitocondriales del TAB en ambos sexos, tanto en situación control, como en respuesta a una dieta hiperlipídica (dieta de cafetería). Además, se ha profundizado en la relación entre la función mitocondrial del TAB y el desarrollo de resistencia a la insulina durante el estado obeso, así como en el papel de las hormonas sexuales en el desarrollo de las diferencias observadas entre sexos.

El TAB es un órgano que se extiende a lo largo de todo el organismo, distribuyéndose en depósitos diferenciados, con características muy concretas en función de su localización anatómica, que le confieren entidad propia a cada uno de ellos. En este estudio se ha trabajado con los depósitos retroperitoneal y gonadal que, a pesar de tener características similares por su ubicación intraabdominal, podrían estar influidos de forma distinta por las hormonas sexuales. En concreto, la proximidad a las gónadas del tejido adiposo gonadal hace pensar en un mayor protagonismo de dichas hormonas en su regulación.

En base a los resultados obtenidos y, a modo de resumen, podemos afirmar que la función y la biogénesis mitocondriales del TAB dependen del sexo, del depósito y de la dieta ingerida.

**En situación control**, las ratas hembra presentan un depósito retroperitoneal con una población mitocondrial menos diferenciada pero más abundante que la de los machos. El perfil contrario se observa en el depósito gonadal, en el que el periovárico presenta una población mitocondrial más diferenciada y más funcional que la del depósito epididimal. Estos resultados constituyen la primera diferencia entre depósitos y sexos descrita en esta tesis en lo que respecta a los parámetros de función y biogénesis mitocondriales. Además, hemos constatado que el grado de diferenciación/funcionalidad mitocondrial está relacionado con la expresión de la adiponectina. Así, la mayor diferenciación mitocondrial del depósito periovárico se traduce en mayores niveles de expresión de la adiponectina en dicho depósito, hecho que coincide, además, con los mayores niveles séricos de adiponectina HMW (la forma más activa de esta adipoquina, con efectos insulino sensibilizantes) observados en las hembras. Este contexto

explicaría el mejor perfil de sensibilidad a la insulina observado en dicho sexo, tanto a nivel sistémico como a nivel tisular, al menos por lo que se refiere al depósito periovárico, que presenta una vía de señalización a la insulina más activa que la del depósito epididimal. Por tanto, las hembras muestran mitocondrias más funcionales que los machos, lo que se traduce en una mayor expresión de adiponectina y, consecuentemente, en una mejor sensibilidad a la insulina.

Este dimorfismo sexual se ve también influenciado por la **edad** de los animales. Así, en un estudio realizado a distintas edades (3, 9 y 18 meses), se pone de manifiesto que a los 9 meses, los machos ya muestran un declive pronunciado de su sensibilidad a la insulina, tanto sistémica como tisular, que se acompaña del incremento de la adiposidad característico de la edad y de una disminución de la adiponectina, mientras que, en las hembras, la alteración de estos parámetros ocurre de forma más gradual, siendo significativa a partir de los 18 meses de edad. En este aspecto, y coincidiendo con el perfil observado a nivel sistémico, los machos muestran una marcada disminución de la activación de la vía de señalización de la insulina (pAkt/Akt) a los 9 meses, mientras que, en las hembras, esta pérdida de capacidad de respuesta a la insulina ocurre de forma gradual, siendo especialmente importante a los 18 meses. Por tanto, se confirma que hay una alteración más temprana de la sensibilidad a la insulina en los machos en comparación con las hembras y que el TAB acusa antes que otros tejidos insulino-dependientes, como el músculo esquelético (Gomez-Perez et al. 2011), las alteraciones de la sensibilidad a la insulina asociadas a la edad, correlacionando mejor con el perfil sistémico.

Las hormonas sexuales se erigen como firmes candidatas responsables del dimorfismo sexual. Para comprobar esta hipótesis se realizó un estudio con **ratas ovariectomizadas**, cuyos resultados ponen de manifiesto una disminución de los niveles circulantes de adiponectina (HMW), así como de su expresión a nivel de depósito periovárico, que a su vez se acompaña de una disminución de la función mitocondrial en este tejido. Esto indica que las hormonas sexuales están implicadas en la regulación de los niveles de adiponectina y refuerza la idea de que la función mitocondrial del TAB está relacionada con la síntesis de

dicha adipoquina. Por su parte, el depósito retroperitoneal no parece responder a este perfil de forma tan marcada, quizá por no ser tan sensible al efecto de los estrógenos, tal como corrobora la falta de respuesta de este depósito a la ovariectomía.

**En respuesta a la dieta HL**, se producen cambios, dependientes del sexo, tanto en la función mitocondrial como en la expresión de adiponectina en los dos depósitos estudiados. El depósito retroperitoneal presenta un claro dimorfismo sexual en respuesta al tratamiento dietético, experimentando proliferación mitocondrial en los machos y diferenciación en las hembras, lo que resulta en una atenuación de las diferencias entre sexos, a nivel de función y biogénesis mitocondriales, observadas en la situación control.

Con la dieta obesogénica, la función mitocondrial se desvincula de la expresión de la adiponectina en el depósito periovárico, asociación previamente observada en la situación control, ya que el incremento de la función mitocondrial no se acompaña de cambios significativos en la expresión de esta adipoquina. Sin embargo, a pesar de ello, las hembras continúan mostrando mayores niveles de adiponectina sérica (HMW) y un mejor perfil de sensibilidad a la insulina, por lo que no es descartable la contribución de otros depósitos adiposos, distintos a los dos estudiados, a los niveles circulantes de esta adipoquina.

Por otra parte, la menor sensibilidad a la insulina observada en los machos obesos, comparados con las hembras, se acompaña de un aumento significativo de los marcadores de dinámica mitocondrial, que sugieren una alteración de la función mitocondrial en el depósito epididimal asociada al estado obeso. Dicha disfunción habría puesto en marcha los procesos de fusión de estos orgánulos con el objetivo de promover la actividad oxidativa y, por tanto, el mantenimiento de una población mitocondrial funcional, estrategia que no parece ser necesaria en el caso del periovárico. En este contexto, tanto el depósito retroperitoneal como el gonadal muestran una menor capacidad antioxidante en los machos que va ligada a un mayor daño oxidativo y que está de acuerdo con esta alteración de la función mitocondrial.

La dieta HL conlleva también un marcado dimorfismo sexual en las características biométricas de los animales. Así, las hembras alcanzan un mayor grado de obesidad y de adiposidad que los machos, confirmando la mayor capacidad de expansión que presentan sus depósitos adiposos. Esta característica derivaría en una menor acumulación de grasa ectópica en órganos como el hígado (Nadal-Casellas et al. 2010) y el músculo esquelético (Gomez-Perez et al. 2008), preservando su funcionalidad, al evitar los efectos de la lipotoxicidad. Además, nuestros resultados indican que el tejido adiposo de las hembras obesas muestra menores signos de hipoxia e inflamación que el de los machos, lo que sugiere una funcionalidad tisular menos alterada. Este hecho está de acuerdo con la mejor funcionalidad mitocondrial observada, lo que repercutiría en el mejor perfil de sensibilidad a la insulina que muestran las hembras.

El estrés oxidativo es un factor clave en el desarrollo de patologías que tienen su origen en la disfunción mitocondrial, como es la resistencia a la insulina (Bonnard et al. 2008; Turner et al. 2008). La estancia realizada por la doctoranda en el grupo de investigación dirigido por el Dr. P. Schrauwen de la Universidad de Maastricht, proporcionó una oportunidad para profundizar en el estudio de los mecanismos moleculares que relacionan estrés oxidativo, disfunción mitocondrial y resistencia a la insulina. El diseño experimental consistió en inducir, en ratones, macho un incremento de la producción de ROS a nivel mitocondrial, mediante la alimentación con una dieta rica en grasas y sacarosa (HLS) y en administrar, paralelamente, un **antioxidante**, conocido como ión Skulachev (SkQ), que tiene como diana de actuación a la mitocondria. Con este planteamiento, se pretendía comprobar si la neutralización de los ROS producidos a nivel mitocondrial preservaba la sensibilidad a la insulina en el músculo esquelético y en el TAB.

Los resultados obtenidos confirman que el antioxidante SkQ reduce el estrés oxidativo inducido por la dieta HLS, tanto a nivel sistémico como a nivel muscular, pero no consigue mejorar la función mitocondrial, la tolerancia a la glucosa, ni la resistencia a la insulina desarrollada en este tejido. La administración del SkQ tampoco mejora la funcionalidad mitocondrial y la

sensibilidad a la insulina en el TAB. Por tanto, estos resultados sugieren que el estrés oxidativo mitocondrial inducido por la dieta HLS no sería el principal factor asociado al desarrollo de la resistencia a la insulina en estos tejidos.





## **5. CONCLUSIONES**

---



## 5. CONCLUSIONES

I. Existe un marcado dimorfismo sexual en la función y biogénesis mitocondriales del tejido adiposo blanco, de forma que las hembras muestran mitocondrias más funcionales que los machos, lo que se traduce en una mayor expresión de adiponectina y, consecuentemente, en una mejor sensibilidad a la insulina. Se confirma, por tanto, una relación entre la función mitocondrial y la expresión de adiponectina.

II. El dimorfismo sexual en la función mitocondrial del tejido adiposo blanco tiene 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 y más abundante que la de los machos. Las hormonas ováricas son responsables, en parte, de este dimorfismo sexual, siendo el depósito gonadal más sensible a la regulación estrogénica, lo que vincula, por tanto, a los estrógenos con el mayor grado de diferenciación mitocondrial y la expresión de adiponectina.

III. El declive de la sensibilidad a la insulina asociado a la edad ocurre de forma más temprana en los machos que en las hembras, en las que, al ser más gradual, se hace evidente a edades más tardías. Además, se confirma que el tejido adiposo blanco experimenta antes que el músculo esquelético, la disminución de la sensibilidad a la insulina.

IV. La obesidad conduce a una atenuación del dimorfismo sexual observado en la función mitocondrial de los animales controles y supone la pérdida de la asociación entre la función mitocondrial y la expresión de adiponectina.

V. En el estado obeso, y contrariamente a lo observado en los machos, las ratas hembra presentan una mayor expandibilidad del tejido adiposo blanco, que se acompaña de un menor grado de hipoxia e inflamación en este tejido y de una

menor alteración de la función mitocondrial, lo cual resulta en un perfil de sensibilidad a la insulina menos alterado.

VI. El estrés oxidativo mitocondrial inducido por una dieta rica en grasa y en sacarosa no sería el principal factor asociado al desarrollo de la resistencia a la insulina, ya que la suplementación con el antioxidante SkQ, a pesar de reducir el estrés oxidativo a nivel global, no consigue paliarla ni a nivel sistémico ni a nivel de los tejidos adiposo blanco y músculo esquelético.

## 5. CONCLUSIONS

I. Sexual dimorphism in mitochondrial biogenesis and function of white adipose tissue exists, with female rats showing more functional mitochondria than males, which leads to greater adiponectin expression and, subsequently, to improved insulin sensitivity. Therefore, the relationship between mitochondrial function and adiponectin expression is confirmed.

II. Sexual dimorphism in the mitochondrial function of white adipose tissue has an opposite profile in the retroperitoneal and gonadal depots. The periovarian depot has a more differentiated, functional mitochondrial population than epididymal fat, whereas the retroperitoneal depot of female rats has a less differentiated, more abundant mitochondrial population than males. Ovarian hormones are responsible, at least in part, for this sexual dimorphism, with the gonadal depot being more sensitive to estrogenic regulation. Therefore, this links estrogens with the greater mitochondrial differentiation and higher adiponectin expression observed in female rats.

III. The drop in age-associated insulin sensitivity occurs at earlier ages in male rats than in females, in which this decline occurs more gradually and becomes evident at later ages. Moreover, it is confirmed that white adipose tissue undergoes the drop in insulin sensitivity before other insulin-dependent tissues such as skeletal muscle.

IV. Obesity leads to a reduction in the sexual dimorphism found in the mitochondrial function of control animals and entails the loss of the relationship between mitochondrial function and adiponectin expression.

V. During obesity, and in contrast to what happens in male rats, females show a greater expandability capacity of their white adipose tissue, which is accompanied by lower levels of hypoxia and inflammation as well as a smaller alteration of the mitochondrial function in this tissue, which leads to a better insulin sensitivity profile.

VI. Oxidative stress induced by a high-fat high-sucrose diet would not be the main factor related to insulin resistance development, as supplementation with the antioxidant SkQ, despite reducing oxidative stress in general, cannot mitigate insulin resistance either in white adipose tissue or in skeletal muscle.

## **6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---





## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ailhaud, G. and G. Reach (2001). "[Does obesity protect against diabetes? A new controversy]." Ann Endocrinol (Paris) **62**(4 Pt 2): S43-54.
- Ali, T. K., S. Matragoon, B. A. Pillai, G. I. Liou and A. B. El-Remessy (2008). "Peroxynitrite mediates retinal neurodegeneration by inhibiting nerve growth factor survival signaling in experimental and human diabetes." Diabetes **57**(4): 889-898.
- Amati, F., M. Pennant, K. Azuma, J. J. Dube, F. G. Toledo, A. P. Rossi, D. E. Kelley and B. H. Goodpaster (2012). "Lower thigh subcutaneous and higher visceral abdominal adipose tissue content both contribute to insulin resistance." Obesity (Silver Spring) **20**(5): 1115-1117.
- Anderson, E. J., M. E. Lustig, K. E. Boyle, T. L. Woodlief, D. A. Kane, C. T. Lin, J. W. Price, 3rd, L. Kang, P. S. Rabinovitch, H. H. Szeto, J. A. Houmard, R. N. Cortright, D. H. Wasserman and P. D. Neuffer (2009). "Mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> emission and cellular redox state link excess fat intake to insulin resistance in both rodents and humans." J Clin Invest.
- Anthony, N. M., M. P. Gaidhu and R. B. Ceddia (2009). "Regulation of visceral and subcutaneous adipocyte lipolysis by acute AICAR-induced AMPK activation." Obesity (Silver Spring) **17**(7): 1312-1317.
- Antonenko, Y. N., A. V. Avetisyan, L. E. Bakeeva, B. V. Chernyak, V. A. Chertkov, L. V. Domnina, O. Y. Ivanova, D. S. Izyumov, L. S. Khailova, S. S. Klishin, G. A. Korshunova, K. G. Lyamzaev, M. S. Muntyan, O. K. Nepryakhina, A. A. Pashkovskaya, O. Y. Pletjushkina, A. V. Pustovidko, V. A. Roginsky, T. I. Rokitskaya, E. K. Ruuge, V. B. Saprunova, Severina, II, R. A. Simonyan, I. V. Skulachev, M. V. Skulachev, N. V. Sumbatyan, I. V. Sviryayeva, V. N. Tashlitsky, J. M. Vassiliev, M. Y. Vyssokikh, L. S. Yaguzhinsky, A. A. Zamyatnin, Jr. and V. P. Skulachev (2008). "Mitochondria-targeted plastoquinone derivatives as tools to interrupt execution of the aging program. 1. Cationic plastoquinone derivatives: synthesis and in vitro studies." Biochemistry (Mosc) **73**(12): 1273-1287.
- Arner, P. (2005). "Human fat cell lipolysis: biochemistry, regulation and clinical role." Best Pract Res Clin Endocrinol Metab **19**(4): 471-482.
- Balaban, R. S., S. Nemoto and T. Finkel (2005). "Mitochondria, oxidants, and aging." Cell **120**(4): 483-495.
- Bereiter-Hahn, J. and M. Voth (1994). "Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria." Microsc Res Tech **27**(3): 198-219.
- Bjorntorp, P. (1991). "Metabolic implications of body fat distribution." Diabetes Care **14**(12): 1132-1143.
- Bloomer, R. J. and K. H. Fisher-Wellman (2010). "Lower postprandial oxidative stress in women compared with men." Gen Med **7**(4): 340-349.
- Bogacka, I., H. Xie, G. A. Bray and S. R. Smith (2005). "Pioglitazone induces mitochondrial biogenesis in human subcutaneous adipose tissue in vivo." Diabetes **54**(5): 1392-1399.
- Bogenhagen, D. and D. A. Clayton (1977). "Mouse L cell mitochondrial DNA molecules are selected randomly for replication throughout the cell cycle." Cell **11**(4): 719-727.
- Bokarewa, M., I. Nagaev, L. Dahlberg, U. Smith and A. Tarkowski (2005). "Resistin, an adipokine with potent proinflammatory properties." J Immunol **174**(9): 5789-5795.
- Bonadonna, R. C., L. C. Groop, K. Zych, M. Shank and R. A. DeFronzo (1990). "Dose-dependent effect of insulin on plasma free fatty acid turnover and oxidation in humans." Am J Physiol **259**(5 Pt 1): E736-750.
- Bonnard, C., A. Durand, S. Peyrol, E. Chanseaume, M. A. Chauvin, B. Morio, H. Vidal and J. Rieusset (2008). "Mitochondrial dysfunction results from oxidative stress in the skeletal muscle of diet-induced insulin-resistant mice." J Clin Invest **118**(2): 789-800.
- Brahimi-Horn, M. C. and J. Pouyssegur (2007). "Oxygen, a source of life and stress." FEBS Lett **581**(19): 3582-3591.

- Brasaemle, D. L., B. Rubin, I. A. Harten, J. Gruia-Gray, A. R. Kimmel and C. Londos (2000). "Perilipin A increases triacylglycerol storage by decreasing the rate of triacylglycerol hydrolysis." *J Biol Chem* **275**(49): 38486-38493.
- Brown, G. C. (1992). "Control of respiration and ATP synthesis in mammalian mitochondria and cells." *Biochem J* **284** ( Pt 1): 1-13.
- Bullo, M., P. Garcia-Lorda, I. Megias and J. Salas-Salvado (2003). "Systemic inflammation, adipose tissue tumor necrosis factor, and leptin expression." *Obes Res* **11**(4): 525-531.
- Campello, S. and L. Scorrano (2010). "Mitochondrial shape changes: orchestrating cell pathophysiology." *EMBO Rep* **11**(9): 678-684.
- Cannon, B. and J. Nedergaard (2004). "Brown adipose tissue: function and physiological significance." *Physiol Rev* **84**(1): 277-359.
- Cinti, S. (2000). "Anatomy of the adipose organ." *Eat Weight Disord* **5**(3): 132-142.
- Cinti, S. (2001). "The adipose organ: morphological perspectives of adipose tissues." *Proc Nutr Soc* **60**(3): 319-328.
- Cinti, S. (2005). "The adipose organ." *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **73**(1): 9-15.
- Civitarese, A. E., C. P. Jenkinson, D. Richardson, M. Bajaj, K. Cusi, S. Kashyap, R. Berria, R. Belfort, R. A. DeFronzo, L. J. Mandarino and E. Ravussin (2004). "Adiponectin receptors gene expression and insulin sensitivity in non-diabetic Mexican Americans with or without a family history of Type 2 diabetes." *Diabetologia* **47**(5): 816-820.
- Civitarese, A. E., S. R. Smith and E. Ravussin (2007). "Diet, energy metabolism and mitochondrial biogenesis." *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **10**(6): 679-687.
- Civitarese, A. E., B. Ukropcova, S. Carling, M. Hulver, R. A. DeFronzo, L. Mandarino, E. Ravussin and S. R. Smith (2006). "Role of adiponectin in human skeletal muscle bioenergetics." *Cell Metab* **4**(1): 75-87.
- Clayton, D. A. (2000). "Vertebrate mitochondrial DNA-a circle of surprises." *Exp Cell Res* **255**(1): 4-9.
- Colom, B., M. P. Alcolea, A. Valle, J. Oliver, P. Roca and F. J. Garcia-Palmer (2007a). "Skeletal muscle of female rats exhibit higher mitochondrial mass and oxidative-phosphorylative capacities compared to males." *Cell Physiol Biochem* **19**(1-4): 205-212.
- Colom, B., J. Oliver, P. Roca and F. J. Garcia-Palmer (2007b). "Caloric restriction and gender modulate cardiac muscle mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and oxidative damage." *Cardiovasc Res* **74**(3): 456-465.
- Conde, J., M. Scotece, R. Gomez, V. Lopez, J. J. Gomez-Reino, F. Lago and O. Gualillo (2011). "Adipokines: Biofactors from white adipose tissue. A complex hub among inflammation, metabolism, and immunity." *Biofactors*.
- Cong, L. N., H. Chen, Y. Li, L. Zhou, M. A. McGibbon, S. I. Taylor and M. J. Quon (1997). "Physiological role of Akt in insulin-stimulated translocation of GLUT4 in transfected rat adipose cells." *Mol Endocrinol* **11**(13): 1881-1890.
- Cusi, K. (2010). "The role of adipose tissue and lipotoxicity in the pathogenesis of type 2 diabetes." *Curr Diab Rep* **10**(4): 306-315.
- Chen, H., A. Chomyn and D. C. Chan (2005). "Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction." *J Biol Chem* **280**(28): 26185-26192.
- Cheng, Z., Y. Tseng and M. F. White (2010). "Insulin signaling meets mitochondria in metabolism." *Trends Endocrinol Metab* **21**(10): 589-598.
- Cheung, P. C., I. P. Salt, S. P. Davies, D. G. Hardie and D. Carling (2000). "Characterization of AMP-activated protein kinase gamma-subunit isoforms and their role in AMP binding." *Biochem J* **346** Pt 3: 659-669.
- Chevillotte, E., M. Giralt, B. Miroux, D. Ricquier and F. Villarroya (2007). "Uncoupling protein-2 controls adiponectin gene expression in adipose tissue through the modulation of reactive oxygen species production." *Diabetes* **56**(4): 1042-1050.
- Chiarugi, P. and T. Fiaschi (2010). "Adiponectin in health and diseases: from metabolic syndrome to tissue regeneration." *Expert Opin Ther Targets* **14**(2): 193-206.

- Choo, H. J., J. H. Kim, O. B. Kwon, C. S. Lee, J. Y. Mun, S. S. Han, Y. S. Yoon, G. Yoon, K. M. Choi and Y. G. Ko (2006). "Mitochondria are impaired in the adipocytes of type 2 diabetic mice." *Diabetologia* **49**(4): 784-791.
- Dairaghi, D. J., G. S. Shadel and D. A. Clayton (1995). "Human mitochondrial transcription factor A and promoter spacing integrity are required for transcription initiation." *Biochim Biophys Acta* **1271**(1): 127-134.
- Daval, M., F. Diot-Dupuy, R. Bazin, I. Hainault, B. Viollet, S. Vaulont, E. Hajduch, P. Ferre and F. Foufelle (2005). "Anti-lipolytic action of AMP-activated protein kinase in rodent adipocytes." *J Biol Chem* **280**(26): 25250-25257.
- Deveaud, C., B. Beauvoit, B. Salin, J. Schaeffer and M. Rigoulet (2004). "Regional differences in oxidative capacity of rat white adipose tissue are linked to the mitochondrial content of mature adipocytes." *Mol Cell Biochem* **267**(1-2): 157-166.
- DiGirolamo, M., J. B. Fine, K. Tagra and R. Rossmanith (1998). "Qualitative regional differences in adipose tissue growth and cellularity in male Wistar rats fed ad libitum." *Am J Physiol* **274**(5 Pt 2): R1460-1467.
- Droge, W. (2002). "Free radicals in the physiological control of cell function." *Physiol Rev* **82**: 47-95.
- Echtay, K. S. (2007). "Mitochondrial uncoupling proteins--what is their physiological role?" *Free Radic Biol Med* **43**(10): 1351-1371.
- Fernandez-Silva, P., J. A. Enriquez and J. Montoya (2003). "Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA." *Exp Physiol* **88**(1): 41-56.
- Fisher, R. P. and D. A. Clayton (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**(20): 11330-11338.
- Fleischmann, E., A. Kurz, M. Niedermayr, K. Schebesta, O. Kimberger, D. I. Sessler, B. Kabon and G. Prager (2005). "Tissue oxygenation in obese and non-obese patients during laparoscopy." *Obes Surg* **15**(6): 813-819.
- Frayn, K. N. (2002). "Adipose tissue as a buffer for daily lipid flux." *Diabetologia* **45**(9): 1201-1210.
- Frazier, A. E., C. Kiu, D. Stojanovski, N. J. Hoogenraad and M. T. Ryan (2006). "Mitochondrial morphology and distribution in mammalian cells." *Biol Chem* **387**(12): 1551-1558.
- Fukui, H. and C. T. Moraes (2008). "The mitochondrial impairment, oxidative stress and neurodegeneration connection: reality or just an attractive hypothesis?" *Trends Neurosci* **31**(5): 251-256.
- Furukawa, S., T. Fujita, M. Shimabukuro, M. Iwaki, Y. Yamada, Y. Nakajima, O. Nakayama, M. Makishima, M. Matsuda and I. Shimomura (2004). "Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome." *J Clin Invest* **114**(12): 1752-1761.
- Gaidhu, M. P., S. Fediuc, N. M. Anthony, M. So, M. Mirpourian, R. L. Perry and R. B. Ceddia (2009). "Prolonged AICAR-induced AMP-kinase activation promotes energy dissipation in white adipocytes: novel mechanisms integrating HSL and ATGL." *J Lipid Res* **50**(4): 704-715.
- Gaidhu, M. P., A. Frontini, S. Hung, K. Pistor, S. Cinti and R. B. Ceddia (2011). "Chronic AMP-kinase activation with AICAR reduces adiposity by remodeling adipocyte metabolism and increasing leptin sensitivity." *J Lipid Res*.
- Gallagher, E. J., D. Leroith and E. Karnieli (2011). "The metabolic syndrome--from insulin resistance to obesity and diabetes." *Med Clin North Am* **95**(5): 855-873.
- Garesse, R. and C. G. Vallejo (2001). "Animal mitochondrial biogenesis and function: a regulatory cross-talk between two genomes." *Gene* **263**(1-2): 1-16.
- Gauthier, M. S., H. Miyoshi, S. C. Souza, J. M. Cacicedo, A. K. Saha, A. S. Greenberg and N. B. Ruderman (2008). "AMP-activated protein kinase is activated as a consequence of

- lipolysis in the adipocyte: potential mechanism and physiological relevance." J Biol Chem **283**(24): 16514-16524.
- Gomez-Perez, Y., E. Amengual-Cladera, A. Catala-Niell, E. Thomas-Moya, M. Gianotti, A. M. Proenza and I. Llado (2008). "Gender dimorphism in high-fat-diet-induced insulin resistance in skeletal muscle of aged rats." Cell Physiol Biochem **22**(5-6): 539-548.
- Gomez-Perez, Y., M. Gianotti, A. M. Proenza and I. Llado (2011). "Age-Related Decline of Skeletal Muscle Insulin Sensitivity in Rats: Effect of Sex and Muscle Type." Rejuvenation Res.
- Goossens, G. H. (2008). "The role of adipose tissue dysfunction in the pathogenesis of obesity-related insulin resistance." Physiol Behav **94**(2): 206-218.
- Groop, L. C., R. C. Bonadonna, D. C. Simonson, A. S. Petrides, M. Shank and R. A. DeFronzo (1992). "Effect of insulin on oxidative and nonoxidative pathways of free fatty acid metabolism in human obesity." Am J Physiol **263**(1 Pt 1): E79-84.
- Guan, H. P., Y. Li, M. V. Jensen, C. B. Newgard, C. M. Steppan and M. A. Lazar (2002). "A futile metabolic cycle activated in adipocytes by antidiabetic agents." Nat Med **8**(10): 1122-1128.
- Guerre-Millo, M. (2004). "Adipose tissue and adipokines: for better or worse." Diabetes Metab **30**(1): 13-19.
- Guevara, R., F. M. Santandreu, A. Valle, M. Gianotti, J. Oliver and P. Roca (2009). "Sex-dependent differences in aged rat brain mitochondrial function and oxidative stress." Free Radic Biol Med **46**(2): 169-175.
- Halberg, N., T. Khan, M. E. Trujillo, I. Wernstedt-Asterholm, A. D. Attie, S. Sherwani, Z. V. Wang, S. Landskroner-Eiger, S. Dineen, U. J. Magalang, R. A. Brekken and P. E. Scherer (2009). "Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  induces fibrosis and insulin resistance in white adipose tissue." Mol Cell Biol **29**(16): 4467-4483.
- Hardie, D. G. (2007). "AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(10): 774-785.
- Hardie, D. G. and D. Carling (1997). "The AMP-activated protein kinase--fuel gauge of the mammalian cell?" Eur J Biochem **246**(2): 259-273.
- Holloszy, J. O. (1967). "Biochemical adaptations in muscle. Effects of exercise on mitochondrial oxygen uptake and respiratory enzyme activity in skeletal muscle." J Biol Chem **242**(9): 2278-2282.
- Ibrahim, M. M. (2010). "Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences." Obes Rev **11**(1): 11-18.
- Inagaki, H., T. Hayashi, Y. Matsushima, K. H. Lin, S. Maeda, S. Ichihara, Y. Kitagawa and T. Saito (2000). "Isolation of rat mitochondrial transcription factor A (r-Tfam) cDNA." DNA Seg **11**(1-2): 131-135.
- Ingerman, E., E. M. Perkins, M. Marino, J. A. Mears, J. M. McCaffery, J. E. Hinshaw and J. Nunnari (2005). "Dnm1 forms spirals that are structurally tailored to fit mitochondria." J Cell Biol **170**(7): 1021-1027.
- Inoue, M., E. F. Sato, M. Nishikawa, A. M. Park, Y. Kira, I. Imada and K. Utsumi (2003). "Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life." Curr Med Chem **10**(23): 2495-2505.
- Justo, R., J. Boada, M. Frontera, J. Oliver, J. Bermudez and M. Gianotti (2005a). "Gender dimorphism in rat liver mitochondrial oxidative metabolism and biogenesis." Am J Physiol Cell Physiol **289**(2): C372-378.
- Justo, R., M. Frontera, E. Pujol, S. Rodriguez-Cuenca, I. Llado, F. J. Garcia-Palmer, P. Roca and M. Gianotti (2005b). "Gender-related differences in morphology and thermogenic capacity of brown adipose tissue mitochondrial subpopulations." Life Sci **76**(10): 1147-1158.

- Justo, R., J. Oliver and M. Gianotti (2005c). "Brown adipose tissue mitochondrial subpopulations show different morphological and thermogenic characteristics." *Mitochondrion* **5**(1): 45-53.
- Kelley, D. E., J. He, E. V. Menshikova and V. B. Ritov (2002). "Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes." *Diabetes* **51**(10): 2944-2950.
- Kelly, D. P. and R. C. Scarpulla (2004). "Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function." *Genes Dev* **18**(4): 357-368.
- Kern, P. A., G. B. Di Gregorio, T. Lu, N. Rassouli and G. Ranganathan (2003). "Adiponectin expression from human adipose tissue: relation to obesity, insulin resistance, and tumor necrosis factor-alpha expression." *Diabetes* **52**(7): 1779-1785.
- Kim, I., S. Rodriguez-Enriquez and J. J. Lemasters (2007). "Selective degradation of mitochondria by mitophagy." *Arch Biochem Biophys* **462**(2): 245-253.
- Koekemoer, T. C., T. G. Downing and W. Oelofsen (1998). "An alternative PCR assay for quantifying mitochondrial DNA in crude preparations." *Nucleic Acids Res* **26**(11): 2829-2830.
- Koh, E. H., J. Y. Park, H. S. Park, M. J. Jeon, J. W. Ryu, M. Kim, S. Y. Kim, M. S. Kim, S. W. Kim, I. S. Park, J. H. Youn and K. U. Lee (2007a). "Essential role of mitochondrial function in adiponectin synthesis in adipocytes." *Diabetes* **56**(12): 2973-2981.
- Koh, H. J., M. F. Hirshman, H. He, Y. Li, Y. Manabe, J. A. Balschi and L. J. Goodyear (2007b). "Adrenaline is a critical mediator of acute exercise-induced AMP-activated protein kinase activation in adipocytes." *Biochem J* **403**(3): 473-481.
- Lafontan, M. (2008). "Advances in adipose tissue metabolism." *Int J Obes (Lond)* **32** Suppl 7: S39-51.
- Lafontan, M., C. Sengenès, J. Galitzky, M. Berlan, I. De Glisezinski, F. Crampes, V. Stich, D. Langin, P. Barbe and D. Riviere (2000). "Recent developments on lipolysis regulation in humans and discovery of a new lipolytic pathway." *Int J Obes Relat Metab Disord* **24** Suppl 4: S47-52.
- Landt, M., R. L. Gingerich, P. J. Havel, W. M. Mueller, B. Schoner, J. E. Hale and M. L. Heiman (1998). "Radioimmunoassay of rat leptin: sexual dimorphism reversed from humans." *Clin Chem* **44**(3): 565-570.
- Lee, H. C. and Y. H. Wei (2005). "Mitochondrial biogenesis and mitochondrial DNA maintenance of mammalian cells under oxidative stress." *Int J Biochem Cell Biol* **37**(4): 822-834.
- Lee, H. C., P. H. Yin, C. Y. Lu, C. W. Chi and Y. H. Wei (2000). "Increase of mitochondria and mitochondrial DNA in response to oxidative stress in human cells." *Biochem J* **348** Pt 2: 425-432.
- Lee, H. C., P. H. Yin, T. N. Yu, Y. D. Chang, W. C. Hsu, S. Y. Kao, C. W. Chi, T. Y. Liu and Y. H. Wei (2001). "Accumulation of mitochondrial DNA deletions in human oral tissues -- effects of betel quid chewing and oral cancer." *Mutat Res* **493**(1-2): 67-74.
- Lefort, N., B. Glancy, B. Bowen, W. T. Willis, Z. Bailowitz, E. A. De Filippis, C. Brophy, C. Meyer, K. Hojlund, Z. Yi and L. J. Mandarino (2010). "Increased reactive oxygen species production and lower abundance of complex I subunits and carnitine palmitoyltransferase 1B protein despite normal mitochondrial respiration in insulin-resistant human skeletal muscle." *Diabetes* **59**(10): 2444-2452.
- Liesa, M., M. Palacin and A. Zorzano (2009). "Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease." *Physiol Rev* **89**(3): 799-845.
- Lihn, A. S., N. Jessen, S. B. Pedersen, S. Lund and B. Richelsen (2004). "AICAR stimulates adiponectin and inhibits cytokines in adipose tissue." *Biochem Biophys Res Commun* **316**(3): 853-858.
- Liu, S., T. Okada, A. Assmann, J. Soto, C. W. Liew, H. Bugger, O. S. Shirihai, E. D. Abel and R. N. Kulkarni (2009). "Insulin signaling regulates mitochondrial function in pancreatic beta-cells." *PLoS One* **4**(11): e7983.

- Lolmede, K., V. Durand de Saint Front, J. Galitzky, M. Lafontan and A. Bouloumie (2003). "Effects of hypoxia on the expression of proangiogenic factors in differentiated 3T3-F442A adipocytes." *Int J Obes Relat Metab Disord* **27**(10): 1187-1195.
- Long, Y. C. and J. R. Zierath (2006). "AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation." *J Clin Invest* **116**(7): 1776-1783.
- Lowell, B. B. and G. I. Shulman (2005). "Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes." *Science* **307**(5708): 384-387.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." *J Biol Chem* **193**(1): 265-275.
- Maritim, A. C., R. A. Sanders and J. B. Watkins, 3rd (2003). "Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review." *J Biochem Mol Toxicol* **17**(1): 24-38.
- Matsuzawa, Y. (2006). "The metabolic syndrome and adipocytokines." *FEBS Lett* **580**(12): 2917-2921.
- Mattingly, K. A., M. M. Ivanova, K. A. Riggs, N. S. Wickramasinghe, M. J. Barch and C. M. Klinge (2008). "Estradiol stimulates transcription of nuclear respiratory factor-1 and increases mitochondrial biogenesis." *Mol Endocrinol* **22**(3): 609-622.
- Mayes, J. S. and G. H. Watson (2004). "Direct effects of sex steroid hormones on adipose tissues and obesity." *Obes Rev* **5**(4): 197-216.
- McKee, E. E. and B. L. Grier (1990). "Insulin stimulates mitochondrial protein synthesis and respiration in isolated perfused rat heart." *Am J Physiol* **259**(3 Pt 1): E413-421.
- Mears, J. A., L. L. Lackner, S. Fang, E. Ingerman, J. Nunnari and J. E. Hinshaw (2011). "Conformational changes in Dnm1 support a contractile mechanism for mitochondrial fission." *Nat Struct Mol Biol* **18**(1): 20-26.
- Medina-Gomez, G., S. Gray and A. Vidal-Puig (2007). "Adipogenesis and lipotoxicity: role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) and PPARgamma coactivator-1 (PGC1)." *Public Health Nutr* **10**(10A): 1132-1137.
- Melov, S. (2000). "Mitochondrial oxidative stress. Physiologic consequences and potential for a role in aging." *Ann N Y Acad Sci* **908**: 219-225.
- Milagro, F. I., J. Campion and J. A. Martinez (2006). "Weight gain induced by high-fat feeding involves increased liver oxidative stress." *Obesity (Silver Spring)* **14**(7): 1118-1123.
- Moraes, C. T. (2001). "What regulates mitochondrial DNA copy number in animal cells?" *Trends Genet* **17**(4): 199-205.
- Nadal-Casellas, A., E. Amengual-Cladera, A. M. Proenza, I. Llado and M. Gianotti (2010). "Long-term high-fat-diet feeding impairs mitochondrial biogenesis in liver of male and female rats." *Cell Physiol Biochem* **26**(3): 291-302.
- Nadal-Casellas, A., A. M. Proenza, M. Gianotti and I. Llad (2011). "Brown adipose tissue redox status in response to dietary-induced obesity-associated oxidative stress in male and female rats." *Stress* **14**(2): 174-184.
- Nicholls, D., S. Cunningham and H. Wiesinger (1986). "Mechanisms of thermogenesis in brown adipose tissue." *Biochem Soc Trans* **14**(2): 223-225.
- Nishikawa, T. and E. Araki (2007). "Impact of mitochondrial ROS production in the pathogenesis of diabetes mellitus and its complications." *Antioxid Redox Signal* **9**(3): 343-353.
- Nishizawa, H., I. Shimomura, K. Kishida, N. Maeda, H. Kuriyama, H. Nagaretani, M. Matsuda, H. Kondo, N. Furuyama, S. Kihara, T. Nakamura, Y. Tochino, T. Funahashi and Y. Matsuzawa (2002). "Androgens decrease plasma adiponectin, an insulin-sensitizing adipocyte-derived protein." *Diabetes* **51**(9): 2734-2741.
- Ohlson, L. O., B. Larsson, K. Svardsudd, L. Welin, H. Eriksson, L. Wilhelmsen, P. Bjorntorp and G. Tibblin (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**(10): 1055-1058.

- Otera, H., C. Wang, M. M. Cleland, K. Setoguchi, S. Yokota, R. J. Youle and K. Mihara (2010). "Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells." J Cell Biol **191**(6): 1141-1158.
- Pajvani, U. B., X. Du, T. P. Combs, A. H. Berg, M. W. Rajala, T. Schulthess, J. Engel, M. Brownlee and P. E. Scherer (2003). "Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrp30/adiponectin. Implications for metabolic regulation and bioactivity." J Biol Chem **278**(11): 9073-9085.
- Palmer, C. S., L. D. Osellame, D. Stojanovski and M. T. Ryan (2011). "The regulation of mitochondrial morphology: Intricate mechanisms and dynamic machinery." Cell Signal **23**(10): 1534-1545.
- Pang, J., Y. Choi and T. Park (2008). "Ilex paraguariensis extract ameliorates obesity induced by high-fat diet: potential role of AMPK in the visceral adipose tissue." Arch Biochem Biophys **476**(2): 178-185.
- Petersen, K. F., S. Dufour and G. I. Shulman (2005). "Decreased insulin-stimulated ATP synthesis and phosphate transport in muscle of insulin-resistant offspring of type 2 diabetic parents." PLoS Med **2**(9): e233.
- Pickavance, L. C. and J. P. Wilding (2007). "Effects of S 15511, a therapeutic metabolite of the insulin-sensitizing agent S 15261, in the Zucker Diabetic Fatty rat." Diabetes Obes Metab **9**(1): 114-120.
- Puigserver, P. and B. M. Spiegelman (2003). "Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator." Endocr Rev **24**(1): 78-90.
- Rebolledo, O. R., C. A. Marra, A. Raschia, S. Rodriguez and J. J. Gagliardino (2008). "Abdominal adipose tissue: early metabolic dysfunction associated to insulin resistance and oxidative stress induced by an unbalanced diet." Horm Metab Res **40**(11): 794-800.
- Renis, M., P. Cantatore, P. Loguercio Polosa, F. Fracasso and M. N. Gadaleta (1989). "Content of mitochondrial DNA and of three mitochondrial RNAs in developing and adult rat cerebellum." J Neurochem **52**(3): 750-754.
- Ricquier, D. and F. Bouillaud (2000). "Mitochondrial uncoupling proteins: from mitochondria to the regulation of energy balance." J Physiol **529 Pt 1**: 3-10.
- Robin, E. D. and R. Wong (1988). "Mitochondrial DNA molecules and virtual number of mitochondria per cell in mammalian cells." J Cell Physiol **136**(3): 507-513.
- Rodriguez-Cuenca, S., M. Monjo, M. Gianotti, A. M. Proenza and P. Roca (2007). "Expression of mitochondrial biogenesis-signaling factors in brown adipocytes is influenced specifically by 17beta-estradiol, testosterone, and progesterone." Am J Physiol Endocrinol Metab **292**(1): E340-346.
- Rodriguez-Cuenca, S., E. Pujol, R. Justo, M. Frontera, J. Oliver, M. Gianotti and P. Roca (2002). "Sex-dependent thermogenesis, differences in mitochondrial morphology and function, and adrenergic response in brown adipose tissue." J Biol Chem **277**(45): 42958-42963.
- Rong, J. X., Y. Qiu, M. K. Hansen, L. Zhu, V. Zhang, M. Xie, Y. Okamoto, M. D. Mattie, H. Higashiyama, S. Asano, J. C. Strum and T. E. Ryan (2007). "Adipose mitochondrial biogenesis is suppressed in db/db and high-fat diet-fed mice and improved by rosiglitazone." Diabetes **56**(7): 1751-1760.
- Rudich, A., H. Kanety and N. Bashan (2007). "Adipose stress-sensing kinases: linking obesity to malfunction." Trends Endocrinol Metab **18**(8): 291-299.
- Rudich, A., A. Tirosh, R. Potashnik, R. Hemi, H. Kanety and N. Bashan (1998). "Prolonged oxidative stress impairs insulin-induced GLUT4 translocation in 3T3-L1 adipocytes." Diabetes **47**(10): 1562-1569.
- Rupnick, M. A., D. Panigrahy, C. Y. Zhang, S. M. Dallabrida, B. B. Lowell, R. Langer and M. J. Folkman (2002). "Adipose tissue mass can be regulated through the vasculature." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(16): 10730-10735.

- Savage, D. B., P. R. Murgatroyd, V. K. Chatterjee and S. O'Rahilly (2005). "Energy expenditure and adaptive responses to an acute hypercaloric fat load in humans with lipodystrophy." J Clin Endocrinol Metab **90**(3): 1446-1452.
- Serviddio, G., A. D. Romano, T. Cassano, F. Bellanti, E. Altomare and G. Vendemiale (2011). "Principles and therapeutic relevance for targeting mitochondria in aging and neurodegenerative diseases." Curr Pharm Des **17**(20): 2036-2055.
- Shadel, G. S. and D. A. Clayton (1997). "Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates." Annu Rev Biochem **66**: 409-435.
- Shay, J. W., D. J. Pierce and H. Werbin (1990). "Mitochondrial DNA copy number is proportional to total cell DNA under a variety of growth conditions." J Biol Chem **265**(25): 14802-14807.
- Shi, H., A. D. Strader, S. C. Woods and R. J. Seeley (2007). "The effect of fat removal on glucose tolerance is depot specific in male and female mice." Am J Physiol Endocrinol Metab **293**(4): E1012-1020.
- Shi, X., A. Burkart, S. M. Nicoloso, M. P. Czech, J. Straubhaar and S. Corvera (2008). "Paradoxical effect of mitochondrial respiratory chain impairment on insulin signaling and glucose transport in adipose cells." J Biol Chem **283**(45): 30658-30667.
- Skulachev, V. P., V. N. Anisimov, Y. N. Antonenko, L. E. Bakeeva, B. V. Chernyak, V. P. Elichev, O. F. Filenko, N. I. Kalinina, V. I. Kapelko, N. G. Kolosova, B. P. Kopnin, G. A. Korshunova, M. R. Lichinitser, L. A. Obukhova, E. G. Pasyukova, O. I. Pisarenko, V. A. Roginsky, E. K. Ruuge, Senin, II, Severina, II, M. V. Skulachev, I. M. Spivak, V. N. Tashlitsky, V. A. Tkachuk, M. Y. Vyssokikh, L. S. Yaguzhinsky and D. B. Zorov (2009). "An attempt to prevent senescence: a mitochondrial approach." Biochim Biophys Acta **1787**(5): 437-461.
- Song, Z., M. Ghochani, J. M. McCaffery, T. G. Frey and D. C. Chan (2009). "Mitofusins and OPA1 mediate sequential steps in mitochondrial membrane fusion." Mol Biol Cell **20**(15): 3525-3532.
- Stapleton, D., K. I. Mitchelhill, G. Gao, J. Widmer, B. J. Michell, T. Teh, C. M. House, C. S. Fernandez, T. Cox, L. A. Witters and B. E. Kemp (1996). "Mammalian AMP-activated protein kinase subfamily." J Biol Chem **271**(2): 611-614.
- Stump, C. S., K. R. Short, M. L. Bigelow, J. M. Schimke and K. S. Nair (2003). "Effect of insulin on human skeletal muscle mitochondrial ATP production, protein synthesis, and mRNA transcripts." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(13): 7996-8001.
- Subramanian, V. and A. W. Ferrante, Jr. (2009). "Obesity, inflammation, and macrophages." Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program **63**: 151-159; discussion 159-162, 259-168.
- Suen, D. F., K. L. Norris and R. J. Youle (2008). "Mitochondrial dynamics and apoptosis." Genes Dev **22**(12): 1577-1590.
- Suliman, H. B., M. S. Carraway, K. E. Welty-Wolf, A. R. Whorton and C. A. Piantadosi (2003). "Lipopolysaccharide stimulates mitochondrial biogenesis via activation of nuclear respiratory factor-1." J Biol Chem **278**(42): 41510-41518.
- Thomas, P. S. and M. N. Farquhar (1978). "Specific measurement of DNA in nuclei and nucleic acids using diamino benzoic acid." Anal Biochem **89**(1): 35-44.
- Tiganis, T. (2011). "Reactive oxygen species and insulin resistance: the good, the bad and the ugly." Trends Pharmacol Sci **32**(2): 82-89.
- Tondera, D., S. Grandemange, A. Jourdain, M. Karbowski, Y. Mattenberger, S. Herzig, S. Da Cruz, P. Clerc, I. Raschke, C. Merkwirth, S. Ehses, F. Krause, D. C. Chan, C. Alexander, C. Bauer, R. Youle, T. Langer and J. C. Martinou (2009). "SLP-2 is required for stress-induced mitochondrial hyperfusion." EMBO J **28**(11): 1589-1600.
- Trayhurn, P., B. Wang and I. S. Wood (2008). "Hypoxia and the endocrine and signalling role of white adipose tissue." Arch Physiol Biochem **114**(4): 267-276.
- Trayhurn, P. and I. S. Wood (2004). "Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue." Br J Nutr **92**(3): 347-355.



- Trayhurn, P. and I. S. Wood (2005). "Signalling role of adipose tissue: adipokines and inflammation in obesity." *Biochem Soc Trans* **33**(Pt 5): 1078-1081.
- Tucholski, K. and E. Otto-Buczkowska (2011). "The role of leptin in the regulation of carbohydrate metabolism." *Endokrynol Pol* **62**(3): 258-262.
- Turner, N. and L. K. Heilbronn (2008). "Is mitochondrial dysfunction a cause of insulin resistance?" *Trends Endocrinol Metab* **19**(9): 324-330.
- Twig, G., A. Elorza, A. J. Molina, H. Mohamed, J. D. Wikstrom, G. Walzer, L. Stiles, S. E. Haigh, S. Katz, G. Las, J. Alroy, M. Wu, B. F. Py, J. Yuan, J. T. Deeney, B. E. Corkey and O. S. Shirihai (2008). "Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy." *EMBO J* **27**(2): 433-446.
- Tworoger, S. S., C. Mantzoros and S. E. Hankinson (2007). "Relationship of plasma adiponectin with sex hormone and insulin-like growth factor levels." *Obesity (Silver Spring)* **15**(9): 2217-2224.
- Vague, J. (1947). "[Not Available]." *Presse Med* **55**(30): 339.
- Valerio, A., A. Cardile, V. Cozzi, R. Bracale, L. Tedesco, A. Pisconti, L. Palomba, O. Cantoni, E. Clementi, S. Moncada, M. O. Carruba and E. Nisoli (2006). "TNF-alpha downregulates eNOS expression and mitochondrial biogenesis in fat and muscle of obese rodents." *J Clin Invest* **116**(10): 2791-2798.
- Valle, A., F. J. Garcia-Palmer, J. Oliver and P. Roca (2007a). "Sex differences in brown adipose tissue thermogenic features during caloric restriction." *Cell Physiol Biochem* **19**(1-4): 195-204.
- Valle, A., R. Guevara, F. J. Garcia-Palmer, P. Roca and J. Oliver (2007b). "Sexual dimorphism in liver mitochondrial oxidative capacity is conserved under caloric restriction conditions." *Am J Physiol Cell Physiol* **293**(4): C1302-1308.
- Vazquez-Vela, M. E., N. Torres and A. R. Tovar (2008). "White adipose tissue as endocrine organ and its role in obesity." *Arch Med Res* **39**(8): 715-728.
- Ventura-Clapier, R., A. Garnier and V. Veksler (2008). "Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1alpha." *Cardiovasc Res* **79**(2): 208-217.
- Villarroya, J., M. Giralt and F. Villarroya (2009). "Mitochondrial DNA: an up-and-coming actor in white adipose tissue pathophysiology." *Obesity (Silver Spring)* **17**(10): 1814-1820.
- Villena, J. A., M. C. Carmona, M. Rodriguez de la Concepcion, M. Rossmeisl, O. Vinas, T. Mampel, R. Iglesias, M. Giralt and F. Villarroya (2002). "Mitochondrial biogenesis in brown adipose tissue is associated with differential expression of transcription regulatory factors." *Cell Mol Life Sci* **59**(11): 1934-1944.
- Vina, J., M. C. Gomez-Cabrera, C. Borrás, T. Froio, F. Sanchis-Gomar, V. E. Martínez-Bello and F. V. Pallardo (2009). "Mitochondrial biogenesis in exercise and in ageing." *Adv Drug Deliv Rev* **61**(14): 1369-1374.
- Vincent, H. K., K. E. Innes and K. R. Vincent (2007). "Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity." *Diabetes Obes Metab* **9**(6): 813-839.
- Virtanen, K. A., P. Lonroth, R. Parkkola, P. Peltoniemi, M. Asola, T. Viljanen, T. Tolvanen, J. Knutti, T. Ronnema, R. Huupponen and P. Nuutila (2002). "Glucose uptake and perfusion in subcutaneous and visceral adipose tissue during insulin stimulation in nonobese and obese humans." *J Clin Endocrinol Metab* **87**(8): 3902-3910.
- Virtue, S. and A. Vidal-Puig (2010). "Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome--an allostatic perspective." *Biochim Biophys Acta* **1801**(3): 338-349.
- Wajchenberg, B. L. (2000). "Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome." *Endocr Rev* **21**(6): 697-738.
- Wallace, T. M., J. C. Levy and D. R. Matthews (2004). "Use and abuse of HOMA modeling." *Diabetes Care* **27**(6): 1487-1495.

- Wang, P., E. Mariman, J. Renes and J. Keijer (2008). "The secretory function of adipocytes in the physiology of white adipose tissue." J Cell Physiol **216**(1): 3-13.
- Weisberg, S. P., D. McCann, M. Desai, M. Rosenbaum, R. L. Leibel and A. W. Ferrante, Jr. (2003). "Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue." J Clin Invest **112**(12): 1796-1808.
- Westermann, B. (2010). "Mitochondrial fusion and fission in cell life and death." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(12): 872-884.
- Wiederkehr, A. and C. B. Wollheim (2012). "Mitochondrial signals drive insulin secretion in the pancreatic beta-cell." Mol Cell Endocrinol **353**(1-2): 128-137.
- Wiesner, R. J., T. T. Kurowski and R. Zak (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**(9): 1458-1467.
- Wilson-Fritch, L., A. Burkart, G. Bell, K. Mendelson, J. Leszyk, S. Nicoloso, M. Czech and S. Corvera (2003). "Mitochondrial biogenesis and remodeling during adipogenesis and in response to the insulin sensitizer rosiglitazone." Mol Cell Biol **23**(3): 1085-1094.
- Wilson-Fritch, L., S. Nicoloso, M. Chouinard, M. A. Lazar, P. C. Chui, J. Leszyk, J. Straubhaar, M. P. Czech and S. Corvera (2004). "Mitochondrial remodeling in adipose tissue associated with obesity and treatment with rosiglitazone." J Clin Invest **114**(9): 1281-1289.
- Williams, R. S., S. Salmons, E. A. Newsholme, R. E. Kaufman and J. Mellor (1986). "Regulation of nuclear and mitochondrial gene expression by contractile activity in skeletal muscle." J Biol Chem **261**(1): 376-380.
- Woods, A., I. Salt, J. Scott, D. G. Hardie and D. Carling (1996). "The alpha1 and alpha2 isoforms of the AMP-activated protein kinase have similar activities in rat liver but exhibit differences in substrate specificity in vitro." FEBS Lett **397**(2-3): 347-351.
- Wu, Z., P. Puigserver, U. Andersson, C. Zhang, G. Adelmant, V. Mootha, A. Troy, S. Cinti, B. Lowell, R. C. Scarpulla and B. M. Spiegelman (1999). "Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1." Cell **98**(1): 115-124.
- Yamauchi, T., J. Kamon, Y. Ito, A. Tsuchida, T. Yokomizo, S. Kita, T. Sugiyama, M. Miyagishi, K. Hara, M. Tsunoda, K. Murakami, T. Ohteki, S. Uchida, S. Takekawa, H. Waki, N. H. Tsuno, Y. Shibata, Y. Terauchi, P. Froguel, K. Tobe, S. Koyasu, K. Taira, T. Kitamura, T. Shimizu, R. Nagai and T. Kadowaki (2003). "Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects." Nature **423**(6941): 762-769.
- Ye, J. (2011). "Adipose tissue vascularization: its role in chronic inflammation." Curr Diab Rep **11**(3): 203-210.
- Zechner, R., J. Strauss, S. Frank, E. Wagner, W. Hofmann, D. Kratky, M. Hiden and S. Levak-Frank (2000). "The role of lipoprotein lipase in adipose tissue development and metabolism." Int J Obes Relat Metab Disord **24 Suppl 4**: S53-56.
- Zhang, Y., R. Proenca, M. Maffei, M. Barone, L. Leopold and J. M. Friedman (1994). "Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue." Nature **372**(6505): 425-432.
- Zorzano, A., M. I. Hernandez-Alvarez, M. Palacin and G. Mingrone (2010). "Alterations in the mitochondrial regulatory pathways constituted by the nuclear co-factors PGC-1alpha or PGC-1beta and mitofusin 2 in skeletal muscle in type 2 diabetes." Biochim Biophys Acta **1797**(6-7): 1028-1033.

## **7. ANEXO 1. MATERIALES Y MÉTODOS**

---



## 7. ANEXO 1. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1. MATERIALES

Panlab (Barcelona, España) nos proporcionó el pienso estándar (A04) usado en nuestros experimentos y los reactivos rutinarios se compraron mayoritariamente en Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EEUU) y en Panreac (Barcelona, España). El resto de proveedores se detallan en el texto de este anexo.

### 7.2. ANIMALES, TRATAMIENTOS Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

La presente tesis doctoral está constituida por resultados procedentes de 4 experimentos diferentes. Para la realización de los 3 primeros se utilizaron ratas Wistar (Charles River, Barcelona, España) de ambos sexos, estabuladas a 22°C con un ciclo diario de 12h de luz/oscuridad. El experimento 4 se llevó a cabo durante una estancia pre-doctoral de 3 meses en la Universidad de Maastricht, en el grupo de investigación *NUTRIM* del Dr. P. Schrauwen. En este experimento se utilizaron ratones macho C57Bl/6 de ocho semanas de edad (Charles River, Maastricht, Holanda). A continuación se indican los detalles de cada uno de los experimentos realizados:

1.- El primer experimento consistió en la inducción de obesidad dietética, utilizando para ello animales de 3 meses de edad de ambos sexos que fueron alimentados, durante 6 meses, *ad libitum* con pienso estándar (Panlab, Barcelona, España) – animales controles – o con una dieta hiperlipídica (HL) llamada dieta de cafetería – animales obesos –. Dicha dieta estaba compuesta por alimentos altamente palatables (galletas dulces, paté de hígado de cerdo, panceta, chocolate y ensaimada) y por pienso estándar. La composición de la dieta HL (3876 kcal/kg de dieta) consistió en un 13% de proteína, un 33% de hidratos de carbono y un 54% de lípidos, mientras que la composición del pienso estándar (3385 kcal/kg de dieta) fue de un 19% de proteínas, un 73% de hidratos de carbono y un 8% de lípidos. Los animales tuvieron libre acceso al agua.

Una vez finalizada la parte correspondiente a la experimentación animal se procedió al sacrificio de los sujetos experimentales. Un periodo de ayuno de 12h precedió dicho sacrificio, el cual tuvo lugar por decapitación con una guillotina para animales de experimentación. La sangre fue recogida inmediatamente y sometida a una centrifugación de 30 minutos a 900 g para la obtención del suero sanguíneo. Durante la disección, los tejidos extraídos se congelaron en nitrógeno líquido y, a continuación, fueron almacenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización. Dichos experimentos cuentan con el beneplácito del comité ético de la UIB y están de acuerdo con la normativa de la UE (2003/65/CE and 86/609/CEE).

2.- En el experimento destinado a comprobar la implicación del  $17\beta$ -estradiol (E2) en las diferencias de sexo observadas en los procesos de biogénesis mitocondrial y sensibilidad a la insulina del TAB durante la obesidad, se utilizaron 3 grupos experimentales de ratas hembras Wistar de 14 semanas de edad, con libre acceso al agua y al pienso estándar. Los grupos se organizaron en controles (n=8), ovariectomizadas a las 5 semanas de edad (OVX) (n=6) y, por último, ovariectomizadas tratadas con  $17\beta$ -estradiol (OVX+E2) (n=6). El reemplazo hormonal en los animales OVX+E2 se llevó a cabo administrando una inyección subcutánea de 10  $\mu\text{g}$  de E2 por kg de peso corporal cada 48 horas, durante 4 semanas. Paralelamente, las OVX fueron inyectadas con el vehículo usado en la administración de E2 (aceite de maíz, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EEUU). El sacrificio de los animales tuvo lugar, como en el primer caso, por decapitación tras un periodo de ayuno de 12h. La sangre fue recogida inmediatamente y sometida a una centrifugación de 30 minutos a 900 g para la obtención del suero sanguíneo. Durante la disección, los tejidos extraídos se congelaron en nitrógeno líquido y a continuación fueron almacenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización. Dichos experimentos cuentan con el beneplácito del comité ético de la UIB y están de acuerdo con la normativa de la UE (2003/65/CE and 86/609/CEE).

3.- En el tercer experimento, se usaron ratas Wistar de ambos sexos de distintas edades (3, 9 y 18 meses) alimentadas con pienso estándar y libre acceso al agua.

El sacrificio de los animales y la recogida de las muestras se realizaron en base al protocolo descrito en los experimentos 1 y 2.

4.- Finalmente, durante la estancia pre-doctoral que la doctoranda realizó en el Departamento de Biología Humana de la Universidad de Maastricht, pudo participar en un estudio planteado con el objetivo de investigar si el uso de un antioxidante dirigido específicamente a la mitocondria – llamado ion de Skulachev o SkQ (prestado por Oleg Fedorkin, Mitotech Inc, Russia) – conseguía mejorar la función mitocondrial y la sensibilidad a la insulina en animales tratados con una dieta obesogénica. Para ello se usaron ratones macho de 8 semanas de edad estabulados con un ciclo de 12h de luz-oscuridad. Dichos animales fueron divididos en 3 grupos experimentales (n = 6) que fueron alimentados durante 16 semanas con: una dieta baja en grasa (Ssniff, Soest, Alemania) – grupo 1 –, una dieta alta en grasa (HL) (Research Diets, New Brunswick, NJ, EEUU) – grupo 2 – o con la dieta HL más el antioxidante SkQ (HL+SkQ) – grupo 3. El SkQ se suministró a través del agua en una concentración de 250 nmol/kg de peso corporal. Las botellas de agua se renovaban 3 veces por semana y tanto el peso corporal como la ingesta energética fueron determinadas mensualmente. Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical tras 16 semanas de tratamiento. La sangre recogida fue centrifugada a 5000 g durante 5 minutos para la obtención del plasma. Los tejidos diseccionados fueron congelados en nitrógeno líquido previo paso por isopentano y, finalmente, fueron almacenados a -80°C hasta su posterior utilización. Dicho procedimiento cuenta con el beneplácito del comité ético para el uso de animales de experimentación de la Universidad de Maastricht.

### **7.3. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS CIRCULANTES**

#### **7.3.1. Glucosa y triacilgliceroles**

Los niveles circulantes de glucosa y triacilgliceroles (TAG) se determinaron con el sistema Accutrend® GCT (Roche Diagnostics, Basel, Suiza) justo después del sacrificio de los animales. Una gota de sangre recogida del cuello del animal se

usó para cubrir una tira comercial específica para glucosa (ref. 11447475) o TAG (ref. 11538144016), respectivamente.

### **7.3.2. Hormonas**

Se utilizaron kits comerciales basados en la técnica de inmunodetección Elisa para determinar los niveles séricos de insulina (Mercodia, Uppsala, Suecia), leptina, adiponectina de alto peso molecular (HMW) y resistina (Biovendor, Heidelberg, Alemania) y adiponectina total (Phoenix Pharmaceuticals Inc, Belmont, CA, EEUU). Esta técnica se fundamenta en el uso de placas de 96 pocillos cuya base ha sido pre-incubada con un anticuerpo específico contra el antígeno a estudiar. El protocolo a seguir en cada caso viene determinado por el fabricante. Finalmente, los niveles séricos de  $17\beta$ -estradiol se determinaron en colaboración con el Laboratorio de Análisis Clínicos de la Policlínica Miramar mediante el uso del kit Immulite<sup>®</sup> 2000 Estradiol (Siemens Healthcare Diagnostics, Barcelona, España).

### **7.3.3. Cálculo del HOMA-IR**

Con el fin de establecer el grado de resistencia a la insulina desarrollado por los animales alimentados con la dieta HL se aplicó el Modelo Homeostático de Valoración de Resistencia a la Insulina (HOMA-IR). Éste fue calculado como la  $[\text{glucosa sanguínea en ayuno (mM)} \times \text{insulina en sangre en ayuno } (\mu\text{U/mL})] / 22,5$ , de acuerdo con Pickavance et al. (Pickavance et al. 2007).

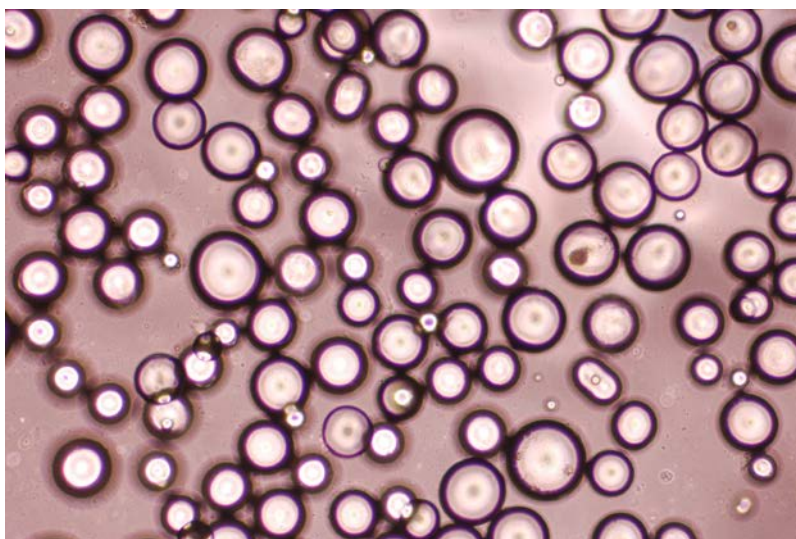
### **7.3.4. Test de tolerancia a la glucosa**

Los tests de tolerancia a la glucosa se realizaron una semana antes del sacrificio de los animales. Para ello, los animales seleccionados se pusieron en ayuno 12 horas antes de la prueba y, justo antes de suministrarles la carga oral de glucosa, se les extrajo sangre de la vena caudal y se determinaron los niveles basales de glucosa mediante el uso del sistema Accutrend<sup>®</sup>. A continuación los animales fueron canulados y se les suministró una carga oral de glucosa de 2 g/kg de peso corporal. A partir de ese momento se les extrajo sangre a los 15, 60 y 120 minutos. Con los datos registrados se definieron las distintas curvas de tolerancia.



#### 7.4. AISLAMIENTO DE ADIPOCITOS

Los depósitos epididimal y periovárico de animales controles y HL fueron extraídos en condiciones asépticas tras el sacrificio del animal. El aislamiento de los adipocitos se realizó mediante una digestión con colagenasa siguiendo el protocolo de Landt et al. (Landt et al. 1998), con ligeras modificaciones. Los depósitos grasos fueron troceados con tijeras en un tampón a pH 7,4 compuesto por D-glucosa 5 mM, 20 g/L BSA, NaCl 135 mM,  $Cl_2Ca$  2,2 mM,  $MgSO_4$  1,25 mM,  $KH_2PO_4$  0,45 mM,  $Na_2HPO_4$  2,17 mM y HEPES 10 mM. Durante el proceso de digestión se utilizaron 2,5 mg de colagenasa tipo 2 disueltos en 2 mL de tampón por gramo de tejido (actividad específica, 456 kU/g; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EEUU), y se dejaron actuar a 37°C con agitación suave, a 60 ciclos/minuto durante 45 minutos. Transcurrido ese tiempo, el tejido digerido fue filtrado usando un malla de nilón de 600  $\mu m$  de tamaño de poro (Spectrumlabs, DG, Breda, Holanda) para separar los adipocitos aislados del tejido sin digerir. Tras realizar 3 lavados con tampón, los adipocitos fueron resuspendidos en DMEM con 4,5 g/L de glucosa, 10% de suero fetal bovino (FBS) y penicilina y estreptomycinina al 1%. Seguidamente, los adipocitos aislados fueron incubados durante 30 minutos a 37°C. Para finalizar, se usaron placas de cultivo de 6 pocillos, los cuales se recubrieron con 500  $\mu L$  de Matrigel (BD Biosciences, Canada, EEUU). Dicha matriz proteica se almacena a -20°C (estado sólido) pero, para poder cubrir con ella la base de los pocillos, debe sacarse del congelador unas 12h antes de su uso y dejarse en la nevera a 4°C para que pase a estado líquido. Al añadir los 500  $\mu L$  de Matrigel a cada pocillo se añadieron también 150  $\mu L$  de la suspensión de adipocitos (en una proporción 2:1 de células respecto a medio) y, al estar a temperatura ambiente, la matriz solidificó formando una capa mínimamente homogénea de adipocitos aislados embebidos en una matriz proteica. A continuación, se añadieron 2 mL de DMEM suplementado con FBS al 10% a cada pocillo y las placas se mantuvieron en una atmósfera al 5% de  $CO_2$  y a 37°C (Imagen 1).



**Imagen 1.** Adipocitos aislados del depósito gonadal de rata y embebidos en una matriz proteica (Matrigel).

Transcurridas 24 horas, los adipocitos fueron tratados con  $H_2O_2$  100, 200 ó 500  $\mu M$ , para inducir una situación de estrés oxidativo puntual, ya que el  $H_2O_2$  se degrada a las pocas horas, y con glucosa oxidasa (GO) 12 y 24 mU/mL, para inducir una situación de estrés oxidativo crónico. El medio utilizado para aplicar el tratamiento fue suplementado con BSA en vez de con suero fetal para evitar interferencias. Tras 18 horas de tratamiento, el medio fue recogido y las células recuperadas y congeladas a  $-80^\circ C$ . Los datos fueron analizados y se decidió seguir el trabajo experimental solamente con el tratamiento con  $H_2O_2$  100  $\mu M$ , al ser el que mejor se ajustaba a los objetivos del estudio.

El efecto del tratamiento con  $H_2O_2$  o GO sobre la viabilidad celular se determinó mediante el uso del kit comercial CytoTox 96<sup>®</sup> Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega Southampton, Reino Unido). Se trata de un método colorimétrico pensado para medir la actividad lactato deshidrogenasa en el medio de cultivo como resultado de su liberación tras una posible lisis celular. Los reactivos se prepararon de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

## 7.5. PREPARACIÓN DE HOMOGENADOS

Entre 300 y 350 mg de TAB retroperitoneal y gonadal, respectivamente, fueron homogeneizados en 1 mL de tampón STE (sacarosa 250 mM, Tris-HCl 5 mM y EGTA 2 mM, pH 7,4). Una alícuota de cada homogenado fue congelada a -20°C con inhibidores de proteasas y fosfatasas (leupeptina 10 µM, pepstatina 10 µM, PMSF 0,2 mM y ortovanadato 0,2 mM) para su posterior análisis por Western blot.

## 7.6. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA Y DEL CONTENIDO DE ADN TOTAL

### 7.6.1. Proteína

La cuantificación de la proteína de los homogenados de TAB se realizó mediante el método Lowry (Lowry et al. 1951). Este método espectrofotométrico es adecuado para la valoración proteica de muestras de muy bajo contenido en proteínas, así como de alto contenido lipídico ya que no interfiere en la determinación.

#### *Fundamento*

El sulfato de cobre y el tartrato Na/K usados para la cuantificación proteica son los principales reactivos necesarios para que tenga lugar la reacción de Biuret. Según esta reacción, el ión  $\text{Cu}^{+2}$  acomplexado con el tartrato Na/K es capaz de fijarse a las parejas de enlaces peptídicos consecutivos de las proteínas, dando lugar a una coloración violácea. Finalmente, al añadir el reactivo de Folin-Ciocalteu, dichos complejos reaccionan formando un complejo reductor Cu-proteína de color más azulado, el cual se ve potenciado por la reducción del fosfomolibdato en medio básico que ocurre al reaccionar con los restos tirosinil de las cadenas polipeptídicas.

*Preparación de reactivos*

1. **Reactivo A** (*Preparar justo antes de cargar la placa*)

- a)  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  1%: 0,78 g en 50 mL de agua bidestilada.
- b) Tartrato Na/K·4H<sub>2</sub>O 2%: 1,34 g en 50 mL de agua bidestilada.
- c)  $\text{CO}_3\text{Na}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  2%: 1,12 g en 50 mL de agua bidestilada.

Una vez preparadas las 3 disoluciones se procede a preparar el Reactivo A mezclando 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  1%, 100 $\mu\text{L}$  de Tartrato Na/K·4H<sub>2</sub>O 2% y 10 mL de  $\text{CO}_3\text{Na}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  2%.

- 2. NaOH 1N: 2,05 g en 50 mL de agua bidestilada
- 3. Albúmina Bovina (BSA), Fracción V de Cohen, 0,1% disuelta en agua bidestilada.
- 4. Reactivo de Folin-Ciocalteu.

*Procedimiento a seguir*

- 1. Descongelar las muestras de TAB de las que se quiere cuantificar la proteína.
- 2. Paralelamente, se prepara un patrón de albúmina bovina (BSA). Para ello se hace un banco de diluciones partiendo de una disolución madre de BSA 0,1%.

TUBO	1	2	3	4	5	6
$\mu\text{L}$ BSA	0	2	4	6	8	10
$\mu\text{g}$ BSA	0	2	4	6	8	10
$\mu\text{L}$ NaOH	50	48	46	44	42	40

3. Preparar una placa Elisa de 96 pocillos estándar. En el caso de nuestros homogenados de TAB, diluir todas las muestras 1/3 con agua destilada y en un volumen suficiente para poder hacer duplicados. Introducir 10  $\mu\text{L}$  de muestra en cada pocillo y añadir NaOH hasta un volumen de 50  $\mu\text{L}$ . Seguidamente, pipetear 225  $\mu\text{L}$  del reactivo A recién preparado y agitar hasta mezclar bien el contenido de los pocillos. En este punto, la placa se deja reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos y, a continuación, se añaden 20  $\mu\text{L}$  del reactivo Folin-Ciocalteu. Nuevamente agitar vigorosamente la placa asegurándose de que el color del contenido de los pocillos sea homogéneo y que no se distingan fases. Finalmente, dejar reposar a temperatura ambiente durante 1 hora y, transcurrido ese tiempo, proceder a la lectura de la densidad óptica a 700 nm.

### 7.6.2. ADN

Para la determinación del ADN total de las muestras de TAB se usó una adaptación para microplaca del método del ácido diaminobenzoico (DABA) (Thomas et al. 1978).

#### *Fundamento*

Este método fluorimétrico se basa en la capacidad del DABA para reaccionar en medio básico con los deoxirribonucleótidos formando aductos fluorescentes estables en medio ácido.

#### *Preparación de reactivos*

1. Ácido diaminobenzoico (DABA) 1,2 M: Pesar 0,27 g/mL de agua bidestilada. **Preparar justo antes de la determinación.**
2. Ácido clorhídrico 1 N: Diluir 8,08 mL de ácido clorhídrico en 100 mL de agua bidestilada.
3. Patrón de ADN: Se utiliza el ADN comercial de esperma de arenque (Sigma D-6898) para preparar una disolución madre a una

concentración de 28,14  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Dicha disolución se prepara en agua bidestilada y se usa para la preparación del banco de diluciones que constituirá la recta patrón.

TUBO	1	2	3	4	5	6	7	8
$\mu\text{L}$ solución madre ADN	0	25	50	75	100	150	175	200
ng ADN	0	703,5	1407	2110,5	2814	4221	4924,5	5628
$\mu\text{L}$ agua	200	175	150	125	100	50	25	0

### *Procedimiento a seguir*

En primer lugar, preparar tantos tubos de fluorimetría como muestras (por duplicado) y puntos de patrón tengamos. Para la determinación de ADN en tejido adiposo blanco, pipetear en los tubos de fluorimetría 35  $\mu\text{L}$  de homogenado y agua bidestilada hasta un volumen final de 200  $\mu\text{L}$ . A continuación, introducir 50  $\mu\text{L}$  del reactivo DABA **recién preparado**. Agitar todos los tubos e incubar a 60°C durante 1 hora. Transcurrido ese tiempo, se enfrían rápidamente las muestras (metiéndolas en hielo) y se añade 1 mL de ácido clorhídrico 1 N. De este modo se estabiliza la reacción. Finalmente, agitar todos los tubos y transferir 300  $\mu\text{L}$  de cada tubo a un pocillo de una placa de fluorimetría. Realizar la lectura en el fluorímetro fijando las siguientes condiciones:

$\lambda_{\text{Excitación}}$ : 360/40

$\lambda_{\text{Emisión}}$ : 528/20

Sensibilidad: 70

## 7.7. DETERMINACIÓN DEL DAÑO OXIDATIVO

### 7.7.1. Cuantificación de grupos carbonilo en proteínas

Como resultado de la oxidación proteica por parte de las ROS, se forman grupos carbonilo en las proteínas que se usan como marcadores del nivel de oxidación proteica. Para su determinación se partió de 5  $\mu\text{g}$  de proteína de los homogenados de TAB y se usó el kit comercial Oxyblot™ Protein Oxidation Detection Kit (Chemicon International, Temecula, CA, EEUU), siguiendo las especificaciones del fabricante, con ligeras modificaciones (Guevara et al. 2009). Además, se adaptó el protocolo al sistema de slot-blot.

#### *Fundamento*

Los grupos carbonilos generados en las cadenas peptídicas de las proteínas son derivatizados con el reactivo 2,4-dinitrofenilhidracina (DNPH) generando el producto 2,4-dinitrofenilhidrazona (DNP-hidrazona), el cual es posteriormente reconocido por el anticuerpo primario. Este método permite detectar hasta 5 femtomoles de grupos carbonilos aumentando considerablemente la eficiencia de la cuantificación respecto a otros métodos como el marcaje con radioisótopos.

#### *Preparación de reactivos:*

#### TAMPÓN

1. Imidazol 25 mM: Pesar 0,34 g en 200 mL de agua bidestilada.
2. EDTA 5 mM (pH 7,2): Pesar 0,372 g en 200 mL de agua bidestilada.

3. Leupeptina 10 $\mu\text{M}$

4. Pepstatina 10  $\mu\text{M}$

5. PMSF 0,2 mM

6. Ortovanadato 0,2 mM

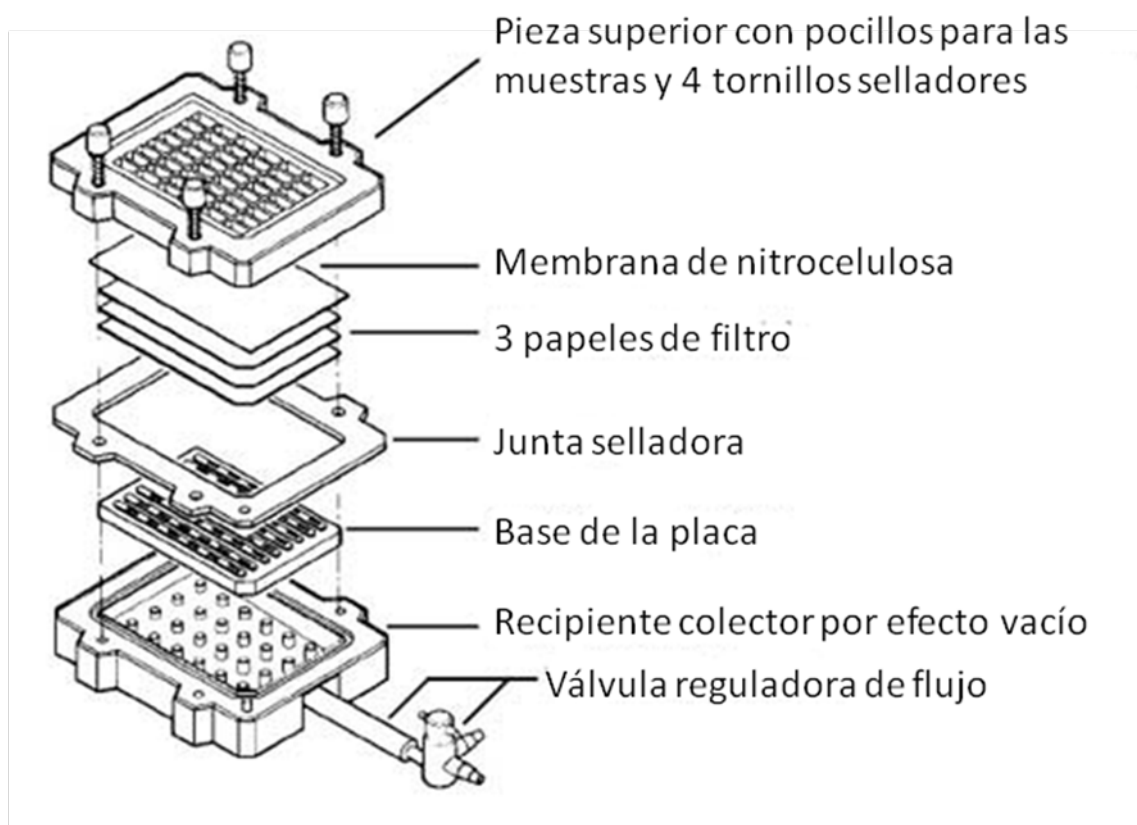
En nuestro caso, como los homogenados de TAB estaban preparados con un tampón STE que ya contenía estos inhibidores de proteasas y fosfatasas, simplemente utilizamos el tampón Imidazol-EDTA para diluir las muestras y conseguir la concentración requerida (5  $\mu\text{g}$  proteína).

### *Procedimiento a seguir*

#### Derivatización de las muestras

Diluir las muestras hasta una concentración de  $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Pipetear  $5 \mu\text{L}$  de cada dilución y añadir  $5 \mu\text{L}$  de SDS al 12% y  $5 \mu\text{L}$  del reactivo de derivatización (DNPH) 1x. Tras 15 minutos de incubación a temperatura ambiente, añadir  $7,5 \mu\text{L}$  de solución de neutralización. Paralelamente se procesa un control negativo, tal como indica el fabricante.

Tras derivatizar las proteínas de la muestra con DNP, éstas se procesan con el sistema de slot-blot (Figura 1). Para ello se añaden  $300 \mu\text{L}$  del tampón de las muestras a cada pocillo justo antes de cargar. A continuación, se carga todo el volumen de muestra derivatizada y, una vez que el sistema de vacío ha absorbido todo el volumen, se añaden  $300 \mu\text{L}$  más de tampón y se vuelve a aplicar vacío para que no quede ningún resto de la muestra en los bordes de los pocillos. Finalizado este paso se desmonta el sistema de slot-blot y se recupera la membrana con las proteínas transferidas a ella.



**Figura 1.** Esquema del sistema de montaje del slot-blot (adaptada de Bio-Rad).



Finalizada la transferencia de las muestras a la membrana, ésta es bloqueada toda la noche con BSA al 1% en PBS-Tween (0,5 g Tween/L PBS). Al día siguiente, dicha membrana es incubada con el anticuerpo primario específico contra el grupo DNP (dilución 1:300, 1h). Tras 2 lavados de 15 minutos con PBS-Tween, se realiza una incubación con el anticuerpo secundario (inmunoglobulina de suero cabra contra IgG de conejo) conjugado con peroxidasa de rábano (dilución 1:300, 1h). Los anticuerpos se preparan con el tampón de bloqueo. Finalmente, se repiten los lavados anteriores y se revela mediante el uso de un kit comercial quimioluminiscente (Bio-Rad, CA, EEUU). La captación y cuantificación de las imágenes se realiza, en nuestro caso, mediante el uso de un captador Chemidoc XRS (Bio-Rad, CA, EEUU) y el software de análisis asociado Quantity one (Bio-Rad, CA, EEUU).

#### **7.7.2. Cuantificación del 4-hidroxinonenal (4-HNE)**

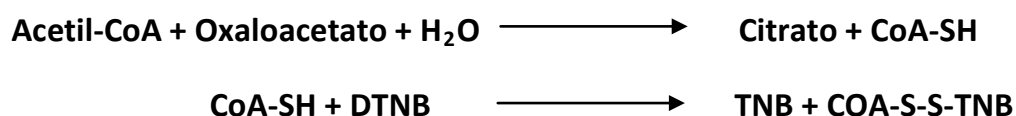
Los niveles de peroxidación lipídica fueron cuantificados a partir de homogenado mediante slot-blot, usando un anticuerpo específico contra el 4-HNE (dilución 1:200), el cual se forma como producto de la descomposición de los peróxidos derivados de ácidos grasos poliinsaturados y ésteres. Para la cuantificación por slot-blot se cargaron 2 µg de proteína por muestra y se siguieron las especificaciones descritas por *Ali et al* (Ali et al. 2008).

### **7.8. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS**

#### **7.8.1. Actividad citrato sintasa (CS)**

##### *Fundamento*

La citrato sintasa es un enzima mitocondrial que cataliza la primera reacción del ciclo de Krebs. La determinación de su actividad enzimática se llevó a cabo según el método previamente descrito por Nakano et al. (2005), registrando el incremento de D.O. a 412 nm producido como resultado de la reducción del ácido dinitrobenzoico (DTNB).



### Preparación de reactivos

Reactivos a utilizar	
Tris	0,16 M (pH 8)
Acetil-CoA *	0,25 mM
5',5'-ditio-dis (ácido 2-nitrobenzoico) [DTNB] *†	3,5 Mm (diluido en Tris 0,16 M a pH 8)
Tritón X-100	0,4%
Ácido oxalacético *	2,5 mM

\* Preparar poco tiempo antes de proceder a la determinación de la actividad enzimática.

† Proteger de la luz.

### Procedimiento a seguir

Coger una placa Elisa y pipetear 120  $\mu\text{L}$  de Tris 0,16 M. Añadir 16  $\mu\text{L}$  de una dilución  $\frac{1}{4}$  de homogenado de TAB, lo cual equivale a 3 – 8  $\mu\text{g}$  de proteína. A continuación, poner 35  $\mu\text{L}$  de acetil-CoA 0,25 mM, 4  $\mu\text{L}$  de DNTB, 35  $\mu\text{L}$  de Tritón X-100 0,4% y, finalmente, 35  $\mu\text{L}$  de ácido oxalacético, alcanzando un volumen final de 245  $\mu\text{L}$ . Una vez añadidos todos los reactivos se agita la microplaca a velocidad media y, mediante la utilización de un espectrofotómetro, se procede a la medida del aumento de la absorbancia a 412 nm resultado de la formación de 5-tio-2-nitrobenzoato (TNB), durante 10 minutos.

$$\epsilon = 13,6 \text{ mM/cm}$$

$$L = 0,765533699$$

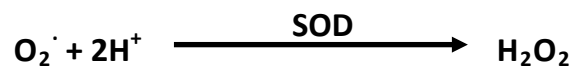
Protocolo adaptado del artículo:

**Platelet mitochondrial evaluation during cytochrome c and dichloroacetate treatments of MELAS.** Nakano, K., Tarashima, M., Tachikawa, E., Noda, N., Nakayama, T., Sasaki, K., Mizoguchi, E., Matsuzaki, M., Osawa, M., 2005. Mitochondrion 5, 426-433.

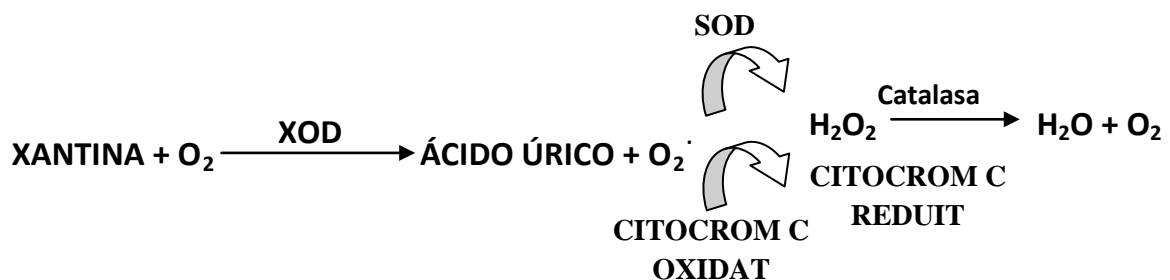
### 7.8.2. Actividad superóxido dismutasa mitocondrial (MnSOD)

#### *Fundamento*

La MnSOD es una isoforma de la superóxido dismutasa que se encuentra en la matriz mitocondrial. Es la principal defensa antioxidante encargada de eliminar el anión superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ) generado a nivel de los complejos de la cadena respiratoria.



El fundamento de este método se basa en que el anión superóxido es una especie radicalaria altamente reactiva y capaz de reducir el citocromo C. Por tanto, el acoplamiento de un conjunto de reacciones que determinan la reducción del citocromo C permiten valorar la actividad de la MnSOD.



La reacción de la xantina oxidasa (XOD) da lugar a la formación del anión superóxido de forma que se reduce el citocromo C. En presencia de superóxido dismutasa (SOD), parte del anión superóxido se transforma en peróxido de hidrógeno y, por tanto, la reducción del citocromo C se ve disminuida.

$$\varepsilon = 28,1 \text{ mM/cm}$$

### Preparación de reactivos

Reactivos a utilizar	
PBS	1x (pH 7,4)
Citocromo C <sup>*</sup>	1,95 mM
Superóxido dismutasa <sup>*</sup>	10200 U/mL
Catalasa <sup>*</sup>	6000 U/mL
Xantina oxidasa <sup>*†</sup>	335 mU/mL
Xantina <sup>‡</sup>	10 mM

<sup>\*</sup> Preparar con PBS pH 7,5. <sup>†</sup> Preparar diariamente. <sup>‡</sup> Preparar en NaOH 30 mM ya que no es soluble en agua.

Reactivos a preparar diariamente a partir de los anteriores:

Reactivo A (volumen final 16 mL)	Reactivo B (volumen final 800 µL)	Reactivo C (volumen final 800 µL)
- 320 µL catalasa	- 57 µL xantina oxidasa	- 57 µL xantina oxidasa
- 320 µL xantina	- 743 µL PBS	- 90 µL superóxido dismutasa
- 755 µL citocromo C	<b>Para 16 muestras multiplicaríamos esto por 4.</b>	- 653 µL PBS
- 14,6 mL PBS		

### *Procedimiento a seguir*

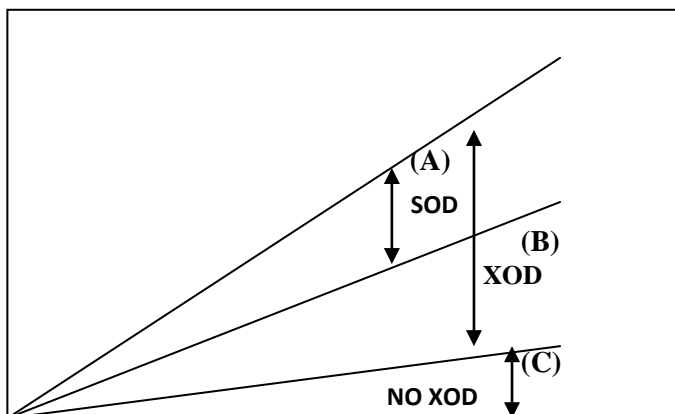
Dado que la MnSOD es un enzima localizado en el interior de la matriz mitocondrial, debe ser solubilizado. Para ello, los homogenados de TAB previamente preparados en tampón STE se sonicar dando 10 pulsos de intensidad media (antes de sonicar se puede diluir la muestra en PBS 1x, pH 7,5). Una vez sonicadas todas las muestras se centrifugan a 10.000 g durante 10 minutos con el objetivo de eliminar los restos de membranas celulares y mitocondriales. El sobrenadante resultante se usa para la determinación de la actividad MnSOD.

Llegados a este punto se carga la placa Elisa introduciendo todos los reactivos en cada pocillo hasta un volumen final de 250  $\mu$ L. A la hora de cargar la placa se deben tener en cuenta las siguientes condiciones:

- A) **Blanco** con agua destilada (250  $\mu$ L)
- B) **Control 1:** 125  $\mu$ L REACTIVO B
- C) **Muestra:** 125  $\mu$ L REACTIVO B + 3-5  $\mu$ L muestra
- D) **Control 2:** 125  $\mu$ L REACTIVO C

Tras cargar el blanco, los controles 1 y 2 y las distintas muestras se añaden 125  $\mu$ L del REACTIVO A a todos los pocillos excepto al de los blancos. A continuación, la placa se agita durante unos 50 segundos y se procede a la lectura con un espectrofotómetro a 550 nm, con el fin de valorar la reducción del citocromo C.

Los controles 1 y 2 en combinación con las muestras nos dan la información necesaria para poder calcular la actividad enzimática específica de la MnSOD:



**A** Permite observar la máxima reducción del citocromo C por parte de la XOD.

**B** Se observa la reducción de citocromo C por la XOD, inhibida por la SOD de la muestra.

**C** El exceso de SOD hace que se inhiba casi completamente la XOD. Por tanto, la reducción del citocromo C que se observa es debida a reacciones que no son de XOD.

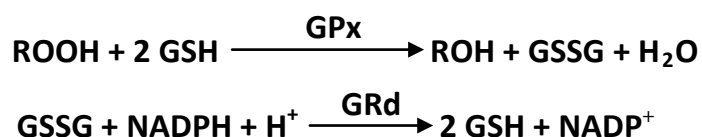
Este método está basado en el artículo:

***Rapid microplate assay for superoxide scavenging efficiency.*** Kevin L. Quick, Joshua I. Hardt, Laura L. Dugan. *Journal of Neuroscience Methods*, (2000), 139-144

### 7.8.3. Glutación peroxidasa

#### *Fundamento*

La Glutatió peroxidasa (GPx) cataliza la reacción de reducción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y peróxidos orgánicos utilizando el glutatió (GSH) como agente reductor. El glutatió oxidado (GSSG) que se genera como resultado de esta reacción es reducido a GSH por el enzima Glutatió reductasa (GRd), proceso que implica la oxidación del NADPH hasta NADP<sup>+</sup>. Por tanto, en presencia de peróxido, GSH, GRd y NADPH, la actividad de la GPx puede cuantificarse midiendo la disminución de absorbancia a 340 nm como resultado de la oxidación del NADPH hasta NADP<sup>+</sup>.



#### *Preparación de reactivos*

- Tampón de reacción: 50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, pH 7,6
- Glutatió reducido (GSH) 100 mM
- NADPH 22 mM
- Glutatió reductasa
- tert-Butil-hidroperóxido 5,5 mM

*Procedimiento a seguir*

1. Preparar el glutatión reducido y el NADPH en agua bidestilada.
2. Preparar cubetas semimicro y añadir los reactivos en el siguiente orden:

Reactivo	Volumen solución stock ( $\mu\text{L}$ )	Concentración final
Tampón de reacción	950	44,8 mM
GSH 100 mM	10	0,94 mM
NADPH 22 mM	10	0,21 mM
GRd 40 U/mL	10	0,38 U/mL
Muestra	40	-

(Recordar preparar un blanco con todos los componentes de la reacción excepto la muestra).

3. Pre-incubar a 37°C durante unos minutos en el espectrofotómetro.
4. Iniciar la reacción añadiendo 40  $\mu\text{L}$  de tert-Butil-hidroperóxido (concentración final 0,22 mM).
5. Leer la disminución de la absorbancia a 340 nm durante 3 minutos.

## 7.9. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS ESPECÍFICAS POR WESTERN BLOT

### *Fundamento*

La electroforesis SDS-PAGE utilizada en este estudio es una técnica de biología molecular que permite la separación de las proteínas desnaturalizadas de una muestra biológica, en base a su peso molecular. Una vez separadas, las proteínas son transferidas desde el gel a una membrana de nitrocelulosa donde son reconocidas por anticuerpos específicos que permiten su identificación y cuantificación.

*Reactivos a utilizar*

1. Tampón Tris-Glicina 1x para la electroforesis
2. Tampón de transferencia:

Para 1 litro

- 200 mL de Tris-Glicina 5x
  - 200 mL de metanol
  - 600 mL de agua destilada
3. Tampón de carga para desnaturalizar y dar densidad a las muestras:

<b>Tampón de carga</b>	
<b>Para 10 mL</b>	<b>Concentración final</b>
<b>2,5 mL de Tris-HCl 1 M, pH 6,8</b>	Tris-HCl 0,25 M
<b>1 g de SDS</b>	SDS 10% (p/v)
<b>4 mL de glicerol</b>	Glicerol 40% (p/v)
<b>1 mL de azul de bromofenol al 1%</b>	Azul de bromofenol 0,1% (p/v)
<b>1,5 ml de H<sub>2</sub>O bidestilada</b>	H <sub>2</sub> O bidestilada
<b>2 mL de β-mercaptoetanol</b>	β-mercaptoetanol 20% (p/v)

*Procedimiento a seguir*

Cargar entre 35-40 µg de proteína de homogenado de TAB al que se le habrán añadido previamente inhibidores de proteasas y fosfatasa (leupeptina 10 µM, pepstatina 10 µM, PMSF 0,2 mM y ortovanadato 0,2 mM). Según el peso molecular de la proteína a estudiar se usa un porcentaje de acrilamida en el gel u otro. Geles más concentrados son adecuados para proteínas de menor peso y los menos concentrados para proteínas de mayor tamaño. En este estudio, se usaron geles de acrilamida al 8, 10, 12 y 15% en función del peso molecular de la proteína en estudio. Una vez finalizada la electroforesis a 200V durante 30-45 minutos con tampón Tris-Glicina 1x, las proteínas se transfieren a una



membrana de nitrocelulosa a 100 V durante 1 hora utilizando un sistema de transferencia húmeda. Para la transferencia de proteínas de alto peso molecular se añaden al tampón de transferencia habitual SDS y  $\beta$ -mercaptoetanol al 0'02% para favorecer el proceso. Una vez finalizada la transferencia se procede a bloquear la membrana durante 1 hora con una solución de leche desnatada al 5% en PBS-Tween (1g/L). Transcurrido ese tiempo, la membrana se incuba con el anticuerpo primario correspondiente y, posteriormente, con el anticuerpo secundario anti-IgG pertinente. Los Ac primarios utilizados se encuentran detallados en la Tabla 1. En este caso, el revelado se llevó a cabo mediante el uso de un kit comercial quimioluminiscente y la captación y cuantificación de las imágenes se realizó mediante el uso de un captador Chemidoc XRS (Bio-Rad, CA, USA) y el software de análisis asociado Quantity one (Bio-Rad, CA, USA).

**Tabla 1.** Relación de anticuerpos primarios usados:

Anticuerpo	Casa comercial	Referencia	Peso molecular (kDa)	Dilución utilizada
<b>AdipoR1</b>	Alpha Diagnostic International (San Antonio, TX, USA)	ADIPOR12-A	42,5	1:500
<b>Akt</b>	Cell Signalling (Danvers, MA, USA)	9271	60	1:200 1:500
<b>AMPK</b>	Cell Signalling (Danvers, MA, USA)	01/2009	60	1:200
<b>Catalasa</b>	Calbiochem (Darmstadt, Germany)	219010	65	1:1000
<b>COXII</b>	Santa Cruz Biotechnology	sc-23984	21	1:500
<b>COXIV</b>	MitoSciences (Eugene, OR, USA)	MS407	16	1:1000
<b>CPT1</b>	Alpha Diagnostic International (San Antonio, TX, USA)	CPT1M11-A	88	1:500
<b>CuZnSOD</b>	Calbiochem (Darmstadt, Germany)	574597	16	1:1000
<b>GLUT4</b>	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)	sc-7938	54	1:200 1:1000
<b>GPx</b>	Calbiochem (Darmstadt, Germany)	ST1000	22,5	1:500
<b>4-HNE</b>	Alpha Diagnostic International (San Antonio, TX, USA)	HNE-11S	--	1:200
<b>IR<math>\beta</math></b>	BD Biosciences (San Jose, CA, USA)	611277	95	1:200 1:1000
<b>IRS</b>	Cell Signalling (Danvers, MA, USA)	10/2008	180	1:200
<b>MnSOD</b>	Calbiochem (Darmstadt, Germany)	574596	25	1:1000
<b>pAkt</b>	Cell Signalling (Danvers, MA, USA)	9272	60	1:200 1:500
<b>pAMPK</b>	Cell Signalling (Danvers, MA, USA)	2531	60	1:250
<b>TFAM</b>	Dr. H. Inagaki (Inagaki et al. 2000)	--	28	1:2000
<b><math>\alpha</math>-Tubulina</b>	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)	sc-5286	55	1:500

## **7.10. AISLAMIENTO DE ARN Y CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA POR PCR A TIEMPO REAL**

### **7.10.1. Aislamiento de ARN**

La extracción del ARN total de las muestras se realizó a partir de 200 mg de TAB gonadal o lumbar de rata, respectivamente, mediante el reactivo comercial Tripure siguiendo las especificaciones del fabricante (Roche Diagnostics, Basel, Suiza). Para el aislamiento de ARN de las muestras de ratón se partió de 80-100 mg de TAB gonadal. La cuantificación del ARN extraído y la valoración de su pureza se determinaron espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 260 nm y 280 nm y calculando el ratio 260nm/280nm, respectivamente.

### **7.10.2. Retrotranscripción**

1 µg de ARN fue retrotranscrito a ADNc durante 60 minutos, a 42°C con 25 U de la retrotranscriptasa MuLV en un volumen final de 10 µL de medio de retrotranscripción. Dicho medio contiene tampón Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM, Triton X<sup>®</sup>-100 0,1%, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, mezcla de hexámeros 2,5 µM, inhibidor de RNasa 10U y dNTP 500 µM. La reacción transcurrió en un Gene Amp 9700 termociclador (Applied Biosystems, Lincoln, CA, USA). El ADNc resultante se diluyó 1/10 con agua libre de ARNasas para evitar posibles interferencias de los reactivos de la retrotranscripción en la PCR a tiempo real y se congeló alicoteado a -20°C hasta el momento de la cuantificación.

### **7.10.3. PCR a tiempo real**

La PCR a tiempo real se realizó para los mensajeros detallados en las tabla 2 y 3. Los cebadores fueron diseñados mediante el programa Primer3. A continuación, se comprobó su capacidad para formar estructuras secundarias con el IDT OligoAnalyser 3.0 y finalmente, se comprobó su homología única para los genes diana con el NCBI Blast.

**Tabla 2.** Secuencias de cebadores de rata utilizados y detalles de las condiciones de la amplificación.

<i>Gen</i>	<i>Cebador Directo (5'-3')</i> <i>Cebador Inverso (5'-3')</i>	<i>Temperatura de Desnaturalización °C (tiempo en s)</i>	<i>Temperatura de Unión °C (tiempo en s)</i>	<i>Temperatura de Extensión °C (tiempo en s)</i>	<i>Tamaño del amplificación</i>	<i>Tm °C</i>
<b><i>NADH (mtDNA)</i></b>	tac acg atg agg caa cca aa ggg agg ggg tgt gtt gtg ag	95 (10)	60 (12)	72 (12)	161 pb	80
<b><i>PGC-1α</i></b>	atg tgt cgc ctt ctt gct ct atc tac tgc ctg ggg acc tt	95 (10)	65 (10)	72 (12)	179 pb	83
<b><i>Mfn1</i></b>	gac gac agc aca tgg aaa ga ctt gcc tga aat cct tct gc	95 (5)	60 (10)	72 (12)	177 pb	80
<b><i>Mfn2</i></b>	agg aaa ttg ctg cca tgc ac gtc tct tct cgg tgc agg tc	95 (5)	60 (10)	72 (12)	174 pb	84
<b><i>Fis1</i></b>	tgt agc gtg aag gat tgc ag ctt cat ctc tgg gca tcc at	95 (5)	60 (10)	72 (12)	203 pb	83
<b><i>Adiponectina</i></b>	gaa ggg aga gaa ggg aga cg cgc tga atg ctg agt gat aca	95 (10)	65 (10)	72 (15)	158 pb	87
<b><i>Leptina</i></b>	cag agg gtc aca cca agg ac ata aaa cgc aaa ggg ctg aa	95 (10)	65 (10)	72 (12)	180 pb	84
<b><i>Resistina</i></b>	cta gct gct cct gtg gct ct agg gca agc tca gtt ctc aa	95 (10)	62 (10)	72 (15)	155 pb	89
<b><i>TNFα</i></b>	ggg tcc gtc cct ctc ata ca aga cac cgc ctg gag ttc t	95 (10)	68 (07)	72 (12)	150 pb	88
<b><i>NFκB</i></b>	gaa ctt gtg ggg aag gac tg ggg gtt att gtt ggt ctg ga	95 (10)	62 (10)	72 (12)	155 pb	86
<b><i>HIF-1α</i></b>	ccc ctt cct cct tca ttt tc gga caa act ccc tca cca aa	95 (10)	65 (15)	72 (12)	159 pb	82
<b><i>PAI-1</i></b>	gac aat gga aga gca aca tg acc tcg atc ttg acc ttt tg	95 (10)	57 (05)	72 (10)	204 pb	86
<b><i>CD68</i></b>	aca cct aca acc acc gga ag gtg gga gaa act gtg gca tt	95 (10)	65 (15)	72 (12)	194 pb	82

**Tabla 3.** Secuencias de cebadores de ratón utilizados y detalles de las condiciones de la amplificación.

<i>Gen</i>	<i>Cebador Directo (5'-3')</i> <i>Cebador Inverso (5'-3')</i>	<i>Temperatura de Desnaturalización °C (tiempo en s)</i>	<i>Temperatura de Unión °C (tiempo en s)</i>	<i>Temperatura de Extensión °C (tiempo en s)</i>	<i>Tamaño del amplificación</i>	<i>Tm °C</i>
<b><i>PGC-1α</i></b>	atg tgt cgc ctt ctt gct ct atc tac tgc ctg ggg acc tt	95 (10)	65 (10)	72 (12)	179 pb	82
<b><i>TFAM</i></b>	agc cag gtc cag ctc act aa aaa ccc aag aaa gca tgt gg	95 (10)	55 (10)	72 (12)	166 pb	77
<b><i>COXIV</i></b>	aga agg cgc tga agg aga agg a cca gca tgc cga ggg agt ga	95 (10)	60 (10)	72 (12)	385 pb	85
<b><i>ATPasa</i></b>	ttc cct tca act cca cca ac cgt tct gaa aag cgt cct tc	95 (10)	54 (10)	72 (12)	183 pb	85
<b><i>CS</i></b>	gtt agc tgg aga cgc ttt gg aga ggc ctg gaa gga aac at	95 (10)	55 (10)	72 (12)	158 pb	77
<b><i>UCP2</i></b>	gcg ttc tgg gta cca tcc ta gct ctg agc cct tgg tgt ag	95 (10)	58 (10)	72 (12)	156pb	88
<b><i>SOD2</i></b>	ccg agg aga agt acc acg ag gct tgc tag cct cca gca ac	95 (10)	58 (10)	72 (12)	174 pb	82
<b><i>GPx1</i></b>	gtc cac cgt gta tgc ctt ct tct gca gat cgt tca tct cg	95 (10)	55 (10)	72 (12)	152 pb	89
<b><i>IR6</i></b>	ctt gga gtg ggt gac ctc at gtg tgt ccc ctt tgc ttt gt	95 (10)	55 (10)	72 (12)	210 pb	81
<b><i>IRS1</i></b>	cca gcc tgg cta ttt agc tg ccc aac tca act cca cca ct	95 (10)	55 (10)	72 (12)	174 pb	86
<b><i>PI3K</i></b>	gct ctt ggc aga aaa agg tg cct ggg cat ctc agt ggt at	95 (10)	55 (10)	72 (12)	169 pb	81
<b><i>Akt1</i></b>	ggg aag gtg att ctg gtg aa gtc gtg ggt ctg gaa tga gt	95 (10)	55 (10)	72 (12)	180 pb	84
<b><i>GLUT4</i></b>	gat tct gct gcc ctt ctg tc att gga cgc tct ctc tcc aa	95 (10)	55 (10)	72 (12)	168 pb	85
<b><i>Adiponectina</i></b>	gtt gca agc tct cct gtt cc tct cca gga gtg cca tct ct	95 (10)	55 (10)	72 (12)	192 pb	86
<b><i>Resistina</i></b>	agg gtg tgt gtg gga att gt cca agg tcc agt ctc ctc tg	95 (10)	58 (10)	72 (12)	170 pb	80
<b><i>18S</i></b>	aaa cgg cta cca cat cca ag cct cca atg gat cct cgt ta	95 (10)	54 (10)	72 (12)	160 pb	83

Para llevar a cabo la PCR a tiempo real se usó un termociclador rápido Lightcycler de capilares (Roche Diagnostics, Basel, Suiza) con el kit LightCycler-FastStart DNA Master SYBR<sup>TM</sup> Green I para el experimento de obesidad y un Lightcycler de placas (Roche Diagnostics, Basel, Suiza) con el kit Lightcycler<sup>®</sup> 480 SYBR Green I Master para el resto de estudios. El volumen final de reacción (adaptado a 10  $\mu$ L) contenía:

#### Para capilares

1  $\mu$ L de la master (constituido por la polimerasa Taq FastStart, una mezcla de dNTPs, tampón de reacción y SYBR Green I), cebadores 0,5  $\mu$ M, MgCl<sub>2</sub> 2 mM y 3  $\mu$ L de la dilución del ADNc en un volumen final de 10 $\mu$ L. El programa de amplificación consistió en un etapa de desnaturalización del ADNc (10 min a 95°C), seguida de 40 ciclos de desnaturalización, unión y elongación. Después de cada ciclo se medía la fluorescencia a 72°C. En cada caso se analizó un control negativo sin ADNc.

Composición de la MIX para capilares:

MIX	Volumen para una muestra ( $\mu$ L)
MgCl <sub>2</sub>	0,8
H <sub>2</sub> O libre de ARNasas	4,7
Cebador F (20 $\mu$ M)	0,25
Cebador R (20 $\mu$ M)	0,25
Master	1

#### Para placas

5  $\mu$ L de la master (constituída por la polimerasa Taq FastStart, una mezcla de dNTPs, tampón de reacción, MgCl<sub>2</sub> y SYBR Green I), primers 0,5  $\mu$ M y 2,5  $\mu$ L de la dilución del ADNc en un volumen final de 10  $\mu$ L. El programa de amplificación consistió en un etapa de desnaturalización del ADNc (5 min a 95°C), seguida de 40 ciclos de desnaturalización, unión y elongación. Después de cada ciclo se

medía la fluorescencia a 72°C. En cada caso se analizó un control negativo sin ADNc.

Composición de la MIX para placas:

MIX	Volumen para una muestra (µL)
H <sub>2</sub> O libre de ARNasas	1,752
Cebador F (10 µM)	0,374
Cebador R (10 µM)	0,374
Master	5

**Detalle:** La eficiencia de cada amplificación depende del tipo de muestra y del par de cebadores usado. Por ello, una vez realizada la real-time, los productos resultantes de la amplificación se mezclaban para formar un único amplificado que era diluido formando un banco de diluciones que servía para hacer un patrón. La pendiente de dicho patrón es usada por el programa informático del Lightcyler para calcular la eficiencia de la reacción. Ésta es más eficiente cuando más cerca de 2 está. Dicha eficiencia se tuvo en cuenta después para hacer los cálculos con el GenEx.

**IMPORTANTE:** La especificidad de la amplificación viene dada por la Tm pero, cada vez que ponemos a punto un nuevo gen, siempre conviene que sea validada mediante un gel de agarosa. Para ello, se pesan 0,45 g de agarosa (Pronadisa, Barcelona, España) en 30 mL de TBE 1x y se añaden 2 µL de bromuro de etidio para hacer el ADN visible bajo la luz UV. A continuación, se favorece su disolución con calor mediante el uso de un microondas y se vierte sobre un soporte específico para geles de acrilamida. Una vez solidificado el gel, se añaden 3-4 µL de cada amplificado en cada pocillo y 2 µL de un marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen, Barcelona, España). Una vez corrido el gel a 80V durante unos 30 min, se procede a su visualización en el ChemiDoc con luz UV.

### **7.11. EXTRACCIÓN Y SEMICUANTIFICACIÓN DEL ADN MITOCONDRIAL**

El ADNmt se extrajo a partir de los homogenados de TAB gonadal y lumbar. Para la extracción se digirió la proteína de la muestra con proteinasa k (100 µg/mL) durante toda la noche. Transcurrido este tiempo las muestras se hirvieron durante 5 minutos para inactivar el enzima. A continuación, se linealizó el ADN mediante una incubación de 3 horas con el enzima de restricción Bcl1 y, finalmente, se procedió a inactivar dicho enzima siguiendo el mismo procedimiento que con la proteinasa k.

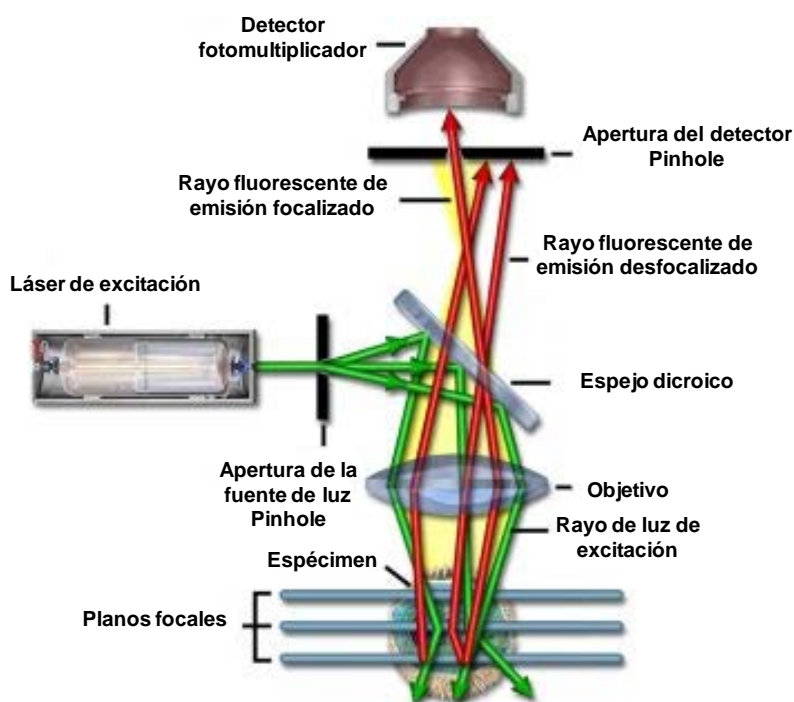
El patrón para realizar la cuantificación se preparó a partir de las muestras a cuantificar. Se amplificó por PCR una mezcla de todas las muestras problema y el ADN resultante se purificó utilizando el kit comercial High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostics, Basel, Suiza). La muestra purificada se usó para hacer un banco de diluciones y definir un patrón que sirvió para hacer la cuantificación del ADNmt por PCR a tiempo real (Koekemoer et al. 1998).

### **7.12. MICROSCOPIA CONFOCAL**

#### *Fundamento*

Un microscopio óptico es un microscopio de fluorescencia que permite procesar distintos tipos de muestras. La confocalidad le permite captar planos focales distintos de una misma muestra para después combinarlos y ofrecer una imagen tridimensional del espécimen examinado. Este proceso se basa en eliminar la luz reflejada o fluorescente procedente de los planos fuera de foco (Figura 2).





**Figura 2.** Esquema del principio de funcionamiento de la microscopía confocal (Figura adaptada).

### *Procedimiento a seguir*

#### **7.12.1. Preparación de las muestras**

Tras la disección, las muestras destinadas a microscopía confocal se guardaron en paraformaldehído al 4%. Su procesamiento se llevó a cabo en el Laboratorio de Anatomía Patológica del Hospital Son Llàtzer. Detalle:

1. Las muestras se embeben en parafina.
2. Una vez formados los bloques de parafina se cortan secciones de 5  $\mu\text{m}$  con el micrótopo.
3. Se colocan entre 2 y 3 cortes en cada porta objetos y se dejan preparados para su posterior procesamiento.

#### **7.12.2. Rehidratación de las muestras**

Previamente a la tinción de las muestras se procede a su desparafinación:

4. Se mantienen los cortes a 60°C durante 20 minutos.

5. Se sumergen durante 5 minutos en el reactivo comercial SuperClean (Conda, Pronadisa, Madrid, España) - equivalente al xileno y no tóxico - para su completa desparafinación.
6. Seguidamente, los cortes son rehidratados secuencialmente sumergiéndolos durante 5 minutos en alcohol de gradaciones decrecientes (100%-95%-70%-50%) y, finalmente, 5 minutos en H<sub>2</sub>O destilada.

### **7.12.3. Tinción de los núcleos**

Todos los cortes se incuban durante 5 minutos con una dilución 1:100 del reactivo Hoesch (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EEUU), disuelto en DMSO.

### **7.12.4. Tinción de las mitocondrias**

Se prepara una solución de Mitotracker Green 100 nM (Molecular Probes, Eugene, OR, EEUU):

- Dado que la solución comercial tiene una concentración de 10<sup>6</sup> nM, se añade 1 µL de dicha solución madre a 9,99 mL de DMSO.

Todos los cortes se incuban con la solución resultante (100 nM) durante una hora a temperatura ambiente y alejados de la luz. Finalmente, las preparaciones se acaban de montar añadiendo una gota de líquido de montaje y un cubre-objetos sobre los cortes teñidos.

Para la captación de imágenes, en este caso, se usó un microscopio confocal marca Leica a un aumento 10x. Se utilizó el programa Leica Application Suite, versión Advance Fluorescence 2.3.6, para captar y procesar las imágenes.

## 7.13. ANÁLISIS DE PROTEÓMICA

### *Fundamento*

La proteómica permite el estudio y caracterización de todas las proteínas de una muestra. Se basa en una electroforesis bidireccional que permite la separación de los péptidos en función de su punto isoeléctrico (primera dimensión) y de su peso molecular (segunda dimensión).

### *Procedimiento a seguir*

Para la extracción de la proteína total de la muestra de TAB gonadal se utilizan 0,3 gramos de tejido, que son homogeneizados en 0,6 mL de tampón de lisis, pH 3-10. Para ello se utiliza un homogeneizador de aspás IKA T10 basic ULTRA-TURAX (1 min a intensidad media).

COMPOSICIÓN DEL TAMPÓN DE LISIS <sup>†</sup>	
Reactivos	Concentraciones
UREA	8,4M
TIOUREA	2,4M
CHAPS	5%
DTT (Ditiotreitol)	50mM
IPG* (Tiras para el isoelectroenfoque, pH 3-10)	1%

\*Añadir al momento y proteger el tampón de la luz. <sup>†</sup>Al ser un medio altamente desnaturizante no es necesario añadir ni antiproteasas ni antifosfatasa.

Tras la homogeneización de las muestras, éstas son vorteadas durante 1 minuto, sonicadas durante 30 segundos y mantenidas a temperatura ambiente durante 1h en agitación (rotación en noria), para favorecer la completa solubilización de las proteínas. A continuación, se centrifugan a 10.000g a 20°C durante 1h. Finalmente se recupera el sobrenadante y, mediante el método Bradford, se cuantifica la proteína total.

### 7.13.1. Primera dimensión

A continuación, se procede a separar las proteínas según su punto isoeléctrico utilizando el gradiente de pH generado en las tiras IPG (immobilized pH gradient)

(17cm; pH 3-10 NL) de Biorad (CA, EEUU). Cada tira de gel es rehidratada mediante su incubación con una solución de rehidratación que contiene 80  $\mu\text{g}$  de proteína (volumen final = 300  $\mu\text{L}$ ) de la muestra a analizar. Finalmente, las tiras se dejan bien planas durante más de 1 hora para que se absorba bien todo el volumen y, seguidamente, se añaden 2 mL de aceite mineral durante 24 horas.

<b>TAMPÓN DE REHIDRATACIÓN</b>	
<b>Reactivos</b>	<b>Concentraciones</b>
UREA	8,3 M
TIOUREA	2 M
CHAPS	2%
AZUL DE BROMOFENOL	0,002%
DTT	1%
IPG anfolitos*	0,5%
HED* (Destreak reagent: sulfuro de hidroxietilo)	100 mM

\*Añadir al momento y proteger el tampón de la luz.

Una vez transcurrido ese tiempo, se elimina el exceso de aceite escurriendo las tiras sobre un papel y después se colocan en la bandeja del isoelectroenfoque (IEF) asegurándose de que están en contacto con los electrodos. Seguidamente, se cubren con 2 mL de aceite mineral y se procede a la separación por punto isoelectroenfoque (pI) mediante el PROTEAN IEF System (Biorad, CA, EEUU), a una corriente máxima de 50 mA/tira. Concretamente, se empieza con un voltaje de 200V y se va incrementando hasta alcanzar los 3000V para terminar estabilizándose a 35000Vh.

Tras el isoelectroenfoque, se escurre el exceso de aceite y, en este punto hay dos posibilidades:

- a. Congelar dichas tiras en una bandeja limpia con el gel hacia arriba.
- b. Continuar con la separación SDS-PAGE.

### 7.13.2. Segunda dimensión

La separación de la segunda dimensión se realiza mediante geles de electroforesis SDS-PAGE al 12%. Preparación de los geles:

Para 4 geles de 40 mL al 12%*
66 mL de H <sub>2</sub> O destilada
80 mL de acrilamida
50 mL de 1,5 M Tris
2 mL de SDS al 10%
<b>Iniciadores de polimerización</b>
2 mL de APS al 10%
80 µL TEMED

\*Una vez montados los geles se añaden 500 µL de isopropanol en la superficie para conseguir una superficie lisa.

Los geles se dejan polimerizar durante unos 30 minutos y, transcurridos 20 minutos, se descongelan las tiras (en los casos en los que estaban congeladas). Una vez descongeladas se procede a su reequilibrado:

1. Paso de reducción: Solución A + DTT, 15 min
2. Paso de alquilación: Solución A+ iodoacetamida 5%, 15 min

Solución de reequilibrado		
	Reactivos	Concentraciones
<b>Solución A</b>	UREA	6M
	SDS	2%
	GLICEROL	30%
	TRIS-HCl (pH = 8,8)	50mM
<b>Paso de reducción</b>	DTT*	1%
<b>Paso de alquilación</b>	Iodoacetamida*	5%

\*Añadir en fresco, se trata de 2 pasos secuenciales de 15 minutos cada uno.

A continuación se elimina el isopropanol de la superficie de los geles y se procede a su montaje en el sistema protean II de Bio-Rad (Ca, EEUU). Al terminar el paso de alquilación de las tiras, éstas se lavan y se colocan sobre el gel evitando la formación de burbujas entre tira y gel. La electroforesis corre con tampón de electroforesis TGS a un voltaje constante de 25mA/gel durante 7h conectada a un baño termostaticado con una temperatura de 20°C. A continuación, las proteínas ya separadas son fijadas al gel mediante una solución de fijación constituida por ácido acético 10% y etanol 40%. Finalmente, los geles son marcados con una tinción comercial fluorescente llamada Flamingo™. Para poder identificar los pesos moleculares de las proteínas se añade un marcador de peso molecular comercial que cubra el rango de 10-200kDa.

### **7.13.3. Fijación y tinción del gel**

Los geles se fijan con 300 mL de la Solución de fijación (10% ácido acético + 4% de EtOH) durante 15 horas con agitación basculante, para evitar que las proteínas precipiten o difundan.

Seguidamente, se elimina el exceso de fijador y, para la tinción de los geles, se prepara el *Flamingo fluorescent gel satín*, diluyendo la solución madre (10x) en agua bidestilada. Se añaden 250 mL por gel y se incuban con agitación basculante durante unas 5 horas.

### **7.13.4. Visualización de proteínas y adquisición de imágenes**

La adquisición de las imágenes de los geles fluorescentes se realiza mediante el captador Molecular Imager FX system (Bio-Rad, CA, EEUU) con una longitud de onda de excitación de 532 nm y filtros de emisión de 555 nm de paso largo. Para analizar las imágenes obtenidas se usa el programa PDQuest 8.0.1 (Bio-Rad, CA, EEUU), con el que se pueden detectar los distintos puntos (spots) y realizar el estudio estadístico, siguiendo las especificaciones del fabricante. Concretamente, tras eliminar el ruido de fondo, los spots de cada gel son emparejados automáticamente con los spots de un gel artificial de referencia generado por el propio PDQuest. Este gel de referencia está basado en uno de

los geles experimentales y es escogido arbitrariamente. Para validar dicho emparejamiento automático, las imágenes de cada gel son revisadas y modificadas manualmente hasta eliminar todas las marcas inespecíficas y artefactos que se podrían haber considerado proteínas de forma errónea. De igual modo, se validan manualmente todos los emparejamientos y los spots que no están presentes en el gel de referencia pero sí en el resto de geles son añadidos durante este proceso. Para calcular la intensidad relativa (IR) de cada spot se usan valores normalizados:

$$IR = v_i/v_t$$

donde  $v_i$  es el volumen de cada spot individual – intensidad de los píxeles integrada sobre el área de cada spot – y,  $v_t$  es la suma de los volúmenes de todos los spots emparejados.

#### **7.13.5. Digestión proteica e identificación de cada spot**

Una vez validados todos los spots, los geles son teñidos con Azul de Comassie y los spots son recortados automáticamente de los geles usando el ExQuest Spot Cutter (Bio-Rad, CA, EEUU). Una vez recortado, cada spot se introducido en un pocillo de una placa Elisa junto con 100  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O destilada.

Seguidamente se procede a la digestión proteica de cada spot siguiendo el protocolo detallado a continuación:

1. Colocar las piezas de gel en eppendorfs con ayuda de una punta de pipeta.
2. Incubar 20 minutos a temperatura ambiente con 100  $\mu$ L de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 25 mM.
3. Incubar 20 minutos a temperatura ambiente con 100  $\mu$ L de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 25 mM/ Acetonitrilo 50%.
4. Aspirar el disolvente y repetir paso 3.
5. Incubar 10 minutos con Acetonitrilo 100%.
6. Aspirar el acetonitrilo y dejar secar el eppendor (aproximadamente 5 min) hasta que el gel quede blanco y suelto.

7. Añadir 10  $\mu\text{L}$  de la *solución de trabajo* de Tripsina. Dicha solución debe prepararse justo antes de su uso y mantenerse en hielo. Se prepara disolviendo 4  $\mu\text{L}$  de la stock solution en 300  $\mu\text{L}$  de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  25 mM (en frío).
8. Incubar 4 h a 37 °C u over night a 30°C (sin agitación).
9. Añadir 10  $\mu\text{L}$  de acetonitrilo 100% e incubar 15 minutos a 37 °C.
10. Añadir 10  $\mu\text{L}$  de TFA 0,3% e incubar 30 minutos a temperatura ambiente (las soluciones de TFA se han de preparar al momento a partir del TFA puro).
11. Sonicar en el baño 5 minutos. En este paso se puede utilizar la muestra para identificar.

Los pasos siguientes son aconsejables para aumentar el rendimiento sin aumentar mucho el coste.

12. Concentrar la muestra en un sistema de generación de vacío como el Speed Vacuum System (Savant Instruments, Holbrook, NT, USA), sin usar temperatura y casi hasta sequedad pero sin que las muestras lleguen a secarse (aproximadamente > 30 minutos)
13. Añadir 5  $\mu\text{L}$  de TFA 0,1%/Acetonitrilo 33% (La solución se ha de preparar al momento).
14. Sonicar 5 minutos.
15. Cargar las muestras obtenidas en una placa para MALDI-TOF/TOF llamada Prespotted AnchorChip™ 96 MALDI target (Brucker Daltonik, Bremen Germany).

**IMPORTANTE:**

- a. Para evitar la contaminación con queratinas se debe trabajar siempre con guantes.
- b. La huella de la masa peptídica obtenida en el MALDI es usada para identificar de los péptidos en la base de datos Swiss-Prot. El programa MASCOT se usa para analizar los datos obtenidos en el MALDI.



- c. Si la proteína no se puede identificar por exceso de contaminantes se puede aplicar el lavado con ZipTip → en nuestro caso este paso no llegó a realizarse para ninguna muestra.

#### 7.14. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se expresaron como la media de cada grupo  $\pm$  el error tipo de 6-8 animales por grupo. El análisis de los crossing-points (Cp) de la RT-PCR se realizó mediante el programa GenEx Standard (MultiDAnalyses, Suecia), teniendo en cuenta la eficiencia de la reacción y refiriendo los resultados al ADN total o al 18S, según el estudio. Para establecer las diferencias entre grupos se aplicó el análisis estadístico más conveniente en cada caso:

- En el experimento de cafetería se aplicó una two-way ANOVA seguida de una T-test en caso de encontrar un efecto interactivo.
- En el experimento realizado con ratas ovariectomizadas y en el experimento resultante de la colaboración con el grupo del Dr. Schrauwen (SkQ) se aplicó una one-way ANOVA seguida del análisis post-hoc LSD.
- En el estudio de edad, se aplicó una two-way ANOVA seguida de una one-way ANOVA y un análisis post-hoc LSD para estudiar el efecto de la edad, mientras que se aplicó una *t-test* para determinar en el efecto del sexo dentro de cada grupo de edad.
- Finalmente, en el estudio resultante de la colaboración con el grupo del Dr. P. Schrauwen se aplicó una one-way ANOVA seguida del post-hoc LSD.

Las diferencias se consideraron significativas cuando la *p* era inferior a 0.05. Para aplicar la estadística se utilizó el programa estadístico SPSS 17.0 para Windows, Inc., Chicago, IL, USA).



## **8.ANEXO 2. PUBLICACIONES COMPLEMENTARIAS**

---



## PUBLICACIONES COMPLEMENTARIAS

Además, durante la realización de la presente tesis, la doctoranda ha colaborado en la realización de experimentos relacionados con su proyecto de tesis que han dado lugar a las publicaciones que forman parte del Anexo 2. / *Furthermore, during this thesis, the PhD student has also been involved in complementary projects that have led to the publication of the manuscripts presented in the appendix:*

- I. Alcolea MP, Colom B, Amengual-Cladera E, Lladó I, Gianotti M, García-Palmer FJ. *Rat visceral yolk sac (VYS) and placenta mitochondrial features during the placentation period.* Mitochondrion. 2008 Dec; 8(5-6):389-95. Epub 2008 Sep 13.
- II. Gómez-Pérez Y, Amengual-Cladera E, Català-Niell A, Thomàs-Moyà E, Gianotti M, Proenza AM, Lladó I. *Gender dimorphism in high-fat-diet-induced insulin resistance in skeletal muscle of aged rats.* Cell Physiol Biochem. 2008; 22(5-6):539-48. Epub 2008 Dec 9.
- III. Nadal-Casellas A, Amengual-Cladera E, Proenza AM, Lladó I, Gianotti M. *Long-term high-fat-diet feeding impairs mitochondrial biogenesis in liver of male and female rats.* Cell Physiol Biochem. 2010; 26(3):291-302. Epub 2010 Aug 24.
- IV. Amengual-Cladera E, Nadal-Casellas A, Gómez-Pérez Y, Gomila I, Prieto RM, Proenza AM, Lladó I. *Phytotherapy in a rat model of hyperoxaluria: the antioxidant effects of quercetin involve serum paraoxonase 1 activation.* Exp Biol Med (Maywood). 2011 Oct 1; 236(10):1133-8. Epub 2011 Sep 5.

*Vivir no es sólo existir,  
Sinó existir y crear,  
Saber gozar y sufrir  
Y no dormir sin soñar.  
Descansar, es empezar a morir.*

*Gregorio marañón.*

*Médico y científico español (1887-1960)*