



UNIVERSITAT DE LES ILLES BALEARS

Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut

Grup de Metabolisme Energètic i Nutrició

**DIFERÈNCIES DE SEXE EN ELS EFECTES DE L'OBESITAT
SOBRE EL PROCÉS DE BIOGÈNESI MITOCONDRIAL.
RELACIÓ AMB LA SENSIBILITAT A LA INSULINA**

Tesi doctoral per optar al grau de

Doctora per la *Universitat de les Illes Balears*

Programa de Doctorat Interuniversitari de Nutrició Humana
del Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut

Presentada per

Antònia Nadal Casellas

Palma, novembre de 2010

Amb el vistiplau de les Directores

Dra. Magdalena Gianotti Bauzà
Professora Titular d'Universitat
Àrea de Bioquímica i Biologia Molecular
Dept. Biologia Fonamental i Ciències de la Salut

Dra. Isabel Lladó Sampol
Professora Titular d'Universitat
Àrea de Bioquímica i Biologia Molecular
Dept. Biologia Fonamental i Ciències de la Salut

La interessada

Antònia Nadal Casellas

En temps d'estiu, cigales

Cançó de ses veritats (autor desconegut)

Agraïments

L'any 2010, un grup de psicòlegs ha arribat a la conclusió que un dels secrets de la felicitat i de la qualitat de vida és **donar les gràcies**. Això em demostra dues coses; per una banda, que els descobriments més evidents sovint passen desapercebuts i, per l'altra, que ser una mica més feliços no costa tant. Per aquest motiu, vull aprofitar l'oportunitat per donar les gràcies a totes les persones que m'han ajudat d'una manera o d'una altra tot el temps que he desenvolupat aquesta tesi doctoral.

En primer lloc, vull expressar gratitud a les meves directores de tesi, la Dra. Magdalena Gianotti i la Dra. Isabel Lladó, per tot el que m'han ensenyat, pel temps que m'han dedicat i per la confiança que han tengut en mi. Així mateix, vull agrair a tots els altres membres del grup d'investigació, el Dr. Francisco J. García, el Dr. Jordi Oliver, la Dra. Pilar Roca, i molt especialment a la Dra. Ana M. Proenza, l'interès que han demostrat pel meu treball i els consells que sempre m'han donat.

Els meus companys del laboratori també han estat un altre puntal important per a mi aquests anys. Per això, vull donar-los les gràcies a tots. Des dels més veterans, com na Pili, en Tomeu, en Roberto i n'Ádamo, fins als més novells, com na Cati, na Gabriela, na Toñi, na Rocío i n'Anto. De tots ells m'agradaria destacar n'Elena, la meva mestra allà on vaig i un exemple a seguir; na Yolanda, per ser tan bona amiga; en Jordi, perquè, si riure allarga la vida, li dec un parell d'anys; el magnífic doctor Miki, per la paciència que ha hagut de tenir amb mi i per haver-me ajudat sempre amb tanta amabilitat i, finalment, en Pere i na Marilena, dos dels millors resultats que he tret d'aquest doctorat. Ja sabeu que a Manacor hi teniu una amiga!

Quan veus els resultats obtinguts després de tantes hores d'estudi i de feina te n'adones que el sacrifici s'ho ha valgut i que la recompensa és grata. Sobretot, però, em sent afortunada perquè, gràcies que he passat per la Universitat, he conegut els meus grans amics: n'Aina i en Xisco. Us he d'agrair tants bons moments que és impossible deixar-ne

constància de tots per escrit. Encara ric quan record els dinars amb la vostra olla, les pràctiques, les biofestes, els viatges, la comunió, les noces, les sortides de festa, els sopars... Gràcies per fer-me sentir tan bé quan estam plegats! No us podeu imaginar com sou d'importants per a mi i com us estim. Però, de la cosa que us estic més agraïda és que em presentàssiu les persones que avui són les meves amigues: na Tita, na Bel, na Xisca, n'Elionor i na Glòria. Gràcies per formar part de la meva vida! Tita, estic segura que qualche dia tendràs el teu imperi, perquè t'ho mereixes i perquè vals molt. Si no, sempre ens quedarà l'opció de dur a terme l'operació \$\$XY\$\$\$. També vull donar les gràcies a na Neus pels bons moments que varem viure juntes quan érem companyes de pis.

I què seria de mi sense la meva família? A ella sí que li dec tot el que som i com som. Per començar, voldria donar les gràcies a la meva «germaneta» Emi: m'has ajudat tant aquests anys, que aquesta tesi també és un poc teva; ets un tresor que conservaré sempre, perquè persones així se'n troben poques! També estic infinitament agraïda a la tia Fuencis i als meus padrins i padrines, que estim tant. Vull destacar especialment una de les persones més importants de la meva vida: el padrí Toni. Padrí, sempre he seguit els teus consells, perquè sé que quan tu dius una cosa s'ho paga escoltar-te. T'he fet cas, padrí, no he amollat i mira on he arribat. Papà, a tu també t'he donat les gràcies per tantes coses! Vull que sàpigues que em sent molt orgullosa cada vegada que em diuen: «és que ets igual que ton pare!». Mamà, no tenc paraules suficients per donar-te les gràcies per tot el que has fet per mi; per tan bé com em cuides, per tan bé com em saps dur, per haver-me ajudat a escalar tantes muntanyes, per haver-me fet riure, per haver-me escoltat, per haver-me consolat... En definitiva, per ser sempre al meu costat quan t'he de menester, sense necessitat d'haver de demanar-te ajuda, perquè tu ets qui em coneixes més bé. T'estimo molt!

Antònia

ÍNDEX

ACRÒNIMS	III
RESUM	VI
LLISTAT DE PUBLICACIONS	VIII
1. INTRODUCCIÓ	1
1.1. Funció i biogènesi mitocondrials	2
1.1.1. Transcripció de proteïnes mitocondrials codificades en el nucli	2
1.1.2. Replicació i transcripció del genoma mitocondrial	5
1.1.3. Regulació de la funció i biogènesi mitocondrials	8
1.1.3.1. Funció mitocondrial i estrès oxidatiu	8
1.1.3.2. Diferències de sexe en la funció mitocondrial	11
1.2. Funció mitocondrial i sensibilitat a la insulina	14
1.2.1. Via de senyalització de la insulina	14
1.2.2. Resistència a la insulina	17
1.2.2.1. L'obesitat com a factor etiològic	18
1.2.2.2. Disfunció mitocondrial i resistència a la insulina	19
1.2.2.3. Adipoquines i resistència a la insulina	20
1.3. Paper metabòlic del teixit adipós marró i del fetge	23
2. OBJECTIUS I PLANTEJAMENT EXPERIMENTAL	25
3. RESULTATS I DISCUSSIÓ	31
3.1. Manuscrit I: Brown adipose tissue redox status in response to dietary-induced obesity-associated oxidative stress in male and female rats	
3.2. Manuscrit II: Sex-dependent differences in rat brown adipose tissue mitochondrial biogenesis and insulin signaling parameters in response to an obesogenic diet	

3.3. Manuscrit III: Sex-dependent differences in rat hepatic lipid accumulation and insulin sensitivity in response to diet-induced obesity	
3.4. Manuscrit IV: Long-term high-fat-diet feeding impairs mitochondrial biogenesis in liver of male and female rats	
3.5. Manuscrit V: Effects of ovariectomy and 17- β estradiol replacement on rat brown adipose tissue mitochondrial function	
4. RECAPITULACIÓ	37
5. CONCLUSIONS	42
6. REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES	45
7. ANNEX 1. RESULTATS NO INCLOSOS EN ELS MANUSCRITS	61
8. ANNEX 2: PUBLICACIONS COMPLEMENTÀRIES	63
8.1. Manuscrit VI: Time-dependent modulation of rat serum paraoxonase 1 activity by fasting	
8.1. Phytotherapy in a rat model of hyperoxaluria: the antioxidant effects of quercetin involve serum paraoxonase 1 activation	

ACRÒNIMS

ADN: àcid desoxiribonucleic

ADNmt: ADN mitocondrial

ADNn: ADN nuclear

ADNpoly: ADN polimerasa mitocondrial

AKT: Ser-Thr cinasa A

AMPc: monofosfat d'adenosina cíclic

AR: receptor adrenèrgic

Arg: arginina

ARN: àcid ribonucleic

ARNm: ARN missatger

ARNr: ARN ribosòmic

ATP: adenosina trifosfat

Cadena H: cadena pesant

Cadena L: cadena lleugera

COX: citocrom *c* oxidasa

CRM: cadena respiratòria mitocondrial

E2: 17- β estradiol

eNOS: òxid nítric sintasa endotelial

ER: receptor d'estrògens

ERE: element de resposta a estrògens

FADH₂: dinucleòtid d'adenilflavina reduït

Glut-4: transportador de glucosa de tipus 4

GMPc: monofosfat de guanosina cíclic

GPx: glutatió peroxidasa

GR: glutatió reductasa

GSH: glutatió reduït

GSSG: glutatió oxidat

H₂O₂: peròxid d'hidrogen

I κ B: inhibidor de l'NF κ B

IL-6: interleucina-6

IR: receptor de la insulina

IRS: substrat del receptor de la insulina

JNK: cinasa amino terminal c-jun

MAPK: MAP cinases

mTERF: factor de terminació de la transcripció mitocondrial

NADH: nicotinamida adenina dinucleòtid reduït

NFκB: factor nuclear kappa B

NO: òxid nítric

NRF: factor nuclear de respiració

•O₂⁻: ió superòxid

•OH: radical hidroxil

O_H: origen de replicació de la cadena pesant

O_L: origen de replicació de la cadena lleugera

•ONOO⁻: radical lliure peroxinitrit

OXPHOS: sistema de fosforilació oxidativa

PDK: cinasa dependent de fosfatidil inositol

PGC: coactivador del receptor activat per proliferadors peroxisomals gamma

P_H: promotor de la cadena pesant

PI3K: fosfatidilinositol 3 cinasa

PIP₂: fosfatidilinositol bifosfat

PIP₃: fosfatidilinositol trifosfat

PKA: proteïna cinasa dependent d'AMPc

PKB: proteïna cinasa B

PKC: proteïna cinasa C

PKG: proteïna cinasa dependent de GMPc

P_L: promotor de la cadena lleugera

POLRMT: polimerasa d'ARN mitocondrial

PRC: coactivador relacionat amb el PGC-1

PTB: domini proteic amb capacitat d'unió a residus de Tyr fosforilats

ROS: espècies reactives d'oxigen

Ser: serina

SOD: superòxid dismutasa

TAM: teixit adipós marró

TFAM: factor de transcripció mitocondrial A

TFBM: factor de transcripció mitocondrial B

Thr: treonina

TNF- α : factor de necrosi tumoral α

Tyr: tirosina

UCP: proteïna desacobladora

VLDL: lipoproteïnes de molt baixa densitat



DIFERÈNCIES DE SEXE EN ELS EFECTES DE L'OBESITAT SOBRE EL PROCÉS DE BIOGÈNESI MITOCONDRIAL. RELACIÓ AMB LA SENSIBILITAT A LA INSULINA

Tesi doctoral, Antònia Nadal Casellas, Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut, Universitat de les Illes Balears, Palma, Espanya.

RESUM

En la capacitat oxidativa mitocondrial del teixit adipós marró (TAM) i del fetge de rata hi ha diferències de sexe que són atribuïdes a la presència de mitocondris més diferenciats i funcionals en les femelles que en els mascles. Una situació d'excés de nutrients —com és el cas de l'obesitat dietètica— podria desencadenar un estat d'estrès oxidatiu i alterar el funcionament mitocondrial a conseqüència dels canvis en el procés de biogènesi mitocondrial. Encara que els mecanismes pels quals l'obesitat dietètica modifica el funcionament mitocondrial no estan completament establerts, hom ha suggerit que hi ha una connexió entre la via de senyalització de la insulina i el procés de biogènesi mitocondrial.

L'eix central d'aquesta tesi ha estat estudiar la influència del sexe de l'individu en els efectes que té l'obesitat sobre la funció i biogènesi mitocondrials del TAM i del fetge, i establir quina relació té amb la sensibilitat tissular a la insulina. Per assolir aquest objectiu, en primer lloc, hem analitzat els efectes que té l'alimentació crònica amb una dieta hiperlipídica sobre els paràmetres de funció i biogènesi mitocondrials, l'estat redox i els elements clau en la via de senyalització de la insulina en el TAM i en el fetge de rates d'ambdós sexes. En segon lloc, hem fet un estudi sobre un model de rates femella ovariectomitzades per aprofundir en el coneixement de la influència que tenen les hormones ovàriques sobre el procés de biogènesi mitocondrial.

Els resultats obtinguts han demostrat que, en part, podem atribuir les diferències de sexe en el funcionament mitocondrial a les hormones ovàriques, i que els efectes de l'obesitat sobre el funcionament mitocondrial i la sensibilitat a la insulina depenen del sexe de l'individu. En comparació amb els mascles, l'alimentació amb una dieta hiperlipídica induïx les rates femella a guanyar més pes corporal, a acumular més greix en el teixit

adipós blanc i a augmentar la resistència a la insulina, tant en el nivell circulant com en el TAM i en el fetge. Per una banda, el fet que el TAM de les rates femella perdi sensibilitat a la insulina podria estar relacionat amb la disminució de la capacitat oxidativa mitocondrial del teixit i amb l'augment del dany oxidatiu. Per altra banda, podem considerar que el fet que el fetge de les rates femella sigui més resistent a la insulina que el dels mascles i que també mantengui una capacitat oxidativa mitocondrial més elevada són mecanismes de protecció enfront de la lipotoxicitat hepàtica induïda per la dieta.

En conjunt, els resultats que hem obtingut en aquesta tesi demostren que els efectes de l'obesitat sobre el funcionament mitocondrial també depenen del teixit. En el fetge de les rates d'ambdós sexes s'activen uns mecanismes per fer front a l'excés de nutrients, que permeten assolir una nova situació d'equilibri i evitar el dany oxidatiu, però en el TAM solament hem observat una resposta compensatòria en els mascles, la qual cosa estaria relacionada amb les diferències de sexe observades en l'augment del pes corporal.

LLISTAT DE PUBLICACIONS

Aquesta tesi doctoral es basa en els articles següents:

I. Nadal-Casellas, A., A. M. Proenza, M. Gianotti, I. Lladó (2010). “Brown adipose tissue redox status in response to dietary-induced obesity-associated oxidative stress in male and female rats.” Stress. In press.

II. Nadal-Casellas, A., A. M. Proenza, M. Gianotti, I. Lladó. “The effect of dietary obesity on mitochondrial functionality and insulin signaling pathway of rat brown adipose tissue is sex-dependent.” Manuscrit.

III. Nadal-Casellas, A., A. M. Proenza, I. Lladó, M. Gianotti. “Sex-dependent differences in rat hepatic lipid accumulation and insulin sensitivity in response to diet-induced obesity.” Manuscrit.

IV. Nadal-Casellas, A., E. Amengual-Cladera, A. M. Proenza, I. Lladó, 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.

V. Nadal-Casellas, A., A. M. Proenza, I. Lladó, M. Gianotti. “Effects of ovariectomy and 17- β estradiol replacement on rat brown adipose tissue mitochondrial function.” Manuscrit.

A més a més, durant la realització d'aquesta tesi, la doctoranda ha col·laborat en la realització d'altres experiments que han donat lloc a les publicacions que formen part de l'annex 2.

VI. Thomàs-Moyà, E., A. Nadal-Casellas, M. Gianotti, I. Lladó, A. M. Proenza (2007). “Time-dependent modulation of rat serum paraoxonase 1 activity by fasting.” Pflügers Arch **453** (6): 831-837.

VII. Amengual-Cladera E., A. Nadal-Casellas, Y. Gómez-Pérez, I. Gomila, R. M. Prieto, A. M. Proenza, I. Lladó. “The antioxidant effects of quercetin in a rat model of hyperoxaluria involve serum paraoxonase 1 activation.” Manuscrit.

1. INTRODUCCIÓ

1. INTRODUCCIÓ

1.1. Funció i biogènesi mitocondrials

Els mitocondris són orgànuls que estan presents en el citoplasma de les cèl·lules eucariotes i, en la majoria dels teixits, tenen la funció principal de proporcionar energia en forma d'ATP. El procés d'obtenció d'energia té lloc gràcies a l'oxidació prèvia dels nutrients durant el cicle de Krebs, la qual cosa genera poder reductor en forma de NADH i FADH₂. Aquestes molècules cedeixen els electrons a la cadena respiratòria mitocondrial (CRM) situada a la membrana interna. La transferència seqüencial d'electrons entre els complexos proteics de la CRM (del complex I al IV) genera energia, que és utilitzada per bombejar protons a l'espai intermembranal del mitocondri, i, d'aquesta manera, sorgeix un gradient electroquímic respecte de la matriu mitocondrial. Els protons tornen a la matriu mitocondrial principalment mitjançant l'ATP sintasa, que aprofita l'energia del gradient per formar ATP.

El contingut de mitocondris i la capacitat oxidativa d'un teixit pot variar en funció de la demanda energètica i de la situació fisiològica. La biogènesi mitocondrial és un procés complex que inclou tant la proliferació com la diferenciació mitocondrials. La proliferació és l'increment del nombre de mitocondris i la diferenciació, l'augment de les capacitats funcionals dels mitocondris preexistents (Ostronoff et al. 1996; Nisoli et al. 2004). Si bé els mitocondris tenen el seu propi genoma, aquest només codifica per a tretze proteïnes, per tant, la síntesi de proteïnes implicades en l'estructura, la funció i biogènesi mitocondrials necessita l'expressió coordinada de dos genomes físicament separats: l'ADN nuclear (ADNn) i l'ADN mitocondrial (ADNmt) (Garesse et al. 2001; Fernandez-Silva et al. 2003).

1.1.1. Transcripció de proteïnes mitocondrials codificades en el nucli

La majoria de les proteïnes mitocondrials estan codificades pel genoma nuclear. Entre aquestes cal destacar la majoria de les subunitats de la CRM, els enzims que estan implicats tant en la β -oxidació dels àcids grassos com en el cicle de Krebs, i els factors reguladors de la replicació i expressió de l'ADNmt (Kelly et al. 2004).

Família del coactivador del receptor activat per proliferadors peroxisomals gamma (PGC)

El PGC-1 α pertany a la família dels coactivadors transcripcionals del PGC-1, juntament amb el seu homòleg, el PGC-1 β , i el coactivador relacionat amb el PGC-1 (PRC). Aquestes tres proteïnes tenen un domini d'activació transcripcional a l'extrem aminoterminal que inclou el motiu LXXLL associat a la interacció amb receptors hormonals nuclears. A més a més, a la regió carboxiterminal hi ha un motiu d'unió a l'ARN ric en Ser i Arg. Això fa que aquesta família de coactivadors es caracteritzi per la presència, a la mateixa molècula, de dominis d'activació transcripcional i de motius relacionats amb el processament de l'ARN (Puigserver et al. 2003).

Cada vegada sembla més evident que el PGC1 α és el regulador principal del procés de biogènesi mitocondrial, el qual fa de nexa entre els estímuls externs i els canvis en la funció mitocondrial (Puigserver et al. 2003; Hock et al. 2009). El PGC1 α exhibeix un patró d'expressió tissular molt específic i és altament induïble a nivell transcripcional (Lin et al. 2005a). Els teixits que tenen sistemes mitocondrials molt desenvolupats, com ara el TAM, el múscul i el ronyó, presenten una expressió elevada de PGC1 α , la qual és induïda en gran part com a resposta a un augment de la demanda energètica condicionada per circumstàncies com el fred, l'exercici o el dejuni, entre d'altres (Puigserver et al. 1998; Wu et al. 1999; Terada et al. 2005). Per això, considerem que el PGC1 α és el punt central en la coordinació de molts de processos cel·lulars implicats en el metabolisme energètic. Això no obstant, el PGC1 α no pot interaccionar amb l'ADN ni modificar les histones, per la qual cosa la seva funció reguladora de l'expressió gènica l'ha de dur a terme mitjançant la interacció amb altres factors i cofactors transcripcionals. A part d'activar la biogènesi mitocondrial, el PGC1 α participa en altres vies de senyalització, entre les quals cal destacar les implicades en el metabolisme de la glucosa i dels àcids grassos. De fet, l'activitat del PGC1 α depèn de la regulació per nutrients (Dominy et al. 2010).

Com el PGC1 α , el PGC1 β també està implicat en el procés de biogènesi mitocondrial (Uldry et al. 2006), encara que la funció d'ambdós coactivadors és lleugerament diferent, ja que el control de la seva expressió no està sotmesa als mateixos estímuls. Així, l'expressió del PGC1 β no augmenta en resposta al fred, al dejuni o a l'exercici,

sinó que és activada per uns àcids grassos determinats i citocines (Lin et al. 2005b; Sonoda et al. 2007).

A diferència dels altres membres d'aquesta família de coactivadors, el PRC presenta una expressió bastant ubíqua, que augmenta principalment durant la fase de proliferació cel·lular; aleshores, desencadena una cascada de senyalització similar a la que té lloc en resposta a un augment del PGC1 α (Gleyzer et al. 2005; Scarpulla 2008).

Factors nuclears de respiració (NRF)

L'NRF1 va ser el primer factor descrit en mamífers que està implicat en la regulació positiva de l'expressió de gens nuclears de respiració. No obstant això, la funció de l'NRF1 no està limitada als gens que codifiquen subunitats dels quatre complexos de la CRM i l'ATP sintasa, sinó que també participa en l'expressió de components del sistema d'importació i acoblament de proteïnes mitocondrials, així com en l'expressió d'elements implicats en la replicació i transcripció de l'ADNmt, entre els quals cal destacar el factor de transcripció mitocondrial A (TFAM), els factors de transcripció mitocondrial B1 (TFB1M) i B2 (TFB2M) i la polimerasa d'ARN mitocondrial (POLRMT) (Scarpulla 2008). A més a més, hom ha suggerit que l'NRF1 també podria constituir el punt d'integració de diverses funcions cel·lulars, tenint en compte que també regula l'expressió d'altres gens que no participen en el procés de biogènesi mitocondrial (Chen et al. 1997; Myers et al. 1998).

L'NRF1 interacciona amb l'ADN en forma d'homodímer (Virbasius et al. 1993a). Aquest factor de transcripció presenta un domini d'activació transcripcional a l'extrem carboxiterminal, mentre que a l'aminoterminal té una regió reguladora de la funció (Gugneja et al. 1996). Concretament, ha estat descrit que la fosforilació en residus de Ser a l'extrem aminoterminal incrementa la capacitat d'unió a l'ADN i també la funció de transactivació (Gugneja et al. 1997; Herzig et al. 2000). A més a més, hom ha vist que l'activitat de l'NRF1 pot ser regulada negativament si és glicosilada (Scarpulla 2006).

L'NRF2 és el segon factor de transcripció descrit que està implicat en l'activació de l'expressió de gens nuclears de respiració. Els promotors regulats per l'NRF2 solen compartir llocs d'unió amb l'NRF1, per tant, l'NRF2 també està implicat en l'expressió

de diversos gens del sistema de fosforilació oxidativa (OXPHOS), així com en l'expressió d'altres gens implicats en les proteïnes de la cadena respiratòria (Virbasius et al. 1993a; Scarpulla 2008). Curiosament, els promotors dels gens del TFAM i TFB1M dels rosegadors, a diferència dels dels humans, tenen llocs d'unió per a l'NRF2, però no per a l'NRF1 (Choi et al. 2002; Falkenberg et al. 2002). De tota manera, sembla que l'NRF1 també activa l'expressió d'aquests gens i probablement ho fa unint-se a altres seqüències (Choi et al. 2002).

L'NRF2 en humans està format per cinc subunitats (α , β_1 , β_2 , γ_1 i γ_2), mentre que el de les rates només consta de tres subunitats (α , β i γ). Les subunitats β promouen que l'NRF2 s'uneixi a l'ADN mitjançant la subunitat α ; finalment, tant les subunitats β com les γ activen la transcripció (Virbasius et al. 1993b). Encara que no està tan descrit com en el cas de l'NRF1, hi ha estudis que assenyalen que és possible que la funció de l'NRF2 també sigui susceptible de ser regulada, per exemple, en resposta a canvis en l'estat redox (Martin et al. 1996; Vallejo et al. 2000).

1.1.2. Replicació i transcripció del genoma mitocondrial

El genoma mitocondrial

Cada mitocondri conté entre dues i deu còpies d'un genoma circular que aproximadament fa 16,6kb, el qual codifica per a un petit conjunt de polipèptids essencials perquè funcioni la CRM (Attardi et al. 1988; Fernandez-Silva et al. 2003). Concretament, el genoma mitocondrial de mamífers està format només per trenta-set gens, tretze dels quals codifiquen subunitats que formen part de tres complexos dels quatre que formen el sistema de fosforilació oxidativa. Concretament, són set subunitats de la NADH: ubiquinona oxidoreductasa (complex I, ND1-6 i ND4L); una subunitat d'ubiquinona: citocrom *c* oxidoreductasa (complex III; citocrom *b*) i tres subunitats de la citocrom *c* oxidasa (complex IV; COXI-III), així com les subunitats 6 i 8 de l'ATP sintasa. Els vint-i-quatre gens restants codifiquen per dos ARN ribosòmics (ARNr) i vint-i-dos ARN de transferència (Garesse et al. 2001).

La replicació i transcripció del genoma mitocondrial té lloc dins el mateix orgànul. Els elements *cis* responsables d'ambdós processos estan situats, majoritàriament, en una petita regió no codificant de l'ADNmt, anomenada *D-loop*, on hi ha les regions

reguladores de cada una de les cadenes de l'ADNmt: els orígens de replicació (O_H i O_L) i els promotors (P_H i P_L) de les cadenes pesants i lleugeres, respectivament (Figura 1) (Garesse et al. 2001).

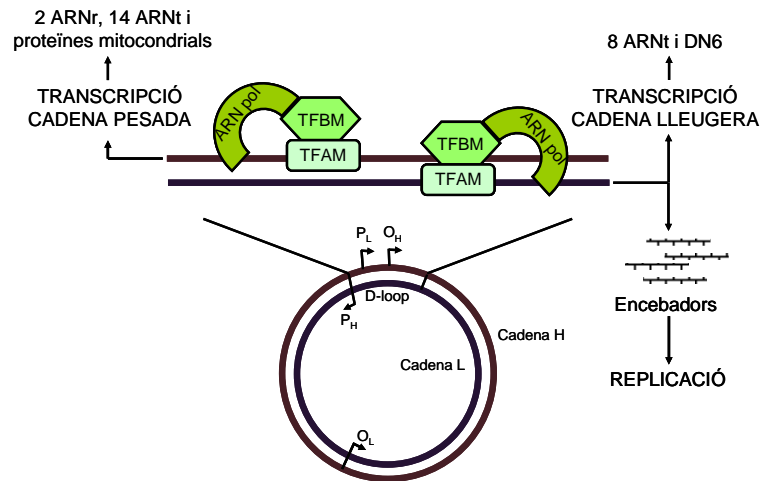


Figura 1. Representació esquemàtica de la transcripció del genoma mitocondrial

Transcripció de l'ADNmt

L'ADNmt es transcriu mitjançant la POLRMT (Masters et al. 1987). Aquesta polimerasa, però, no pot interactuar amb els promotors de l'ADNmt i començar l'expressió per si mateixa, sinó que hi han de participar altres proteïnes, entre les quals cal destacar el TFAM, el TFB1M i el TFB2M.

Factor de transcripció mitocondrial A (TFAM)

El TFAM pertany a la família de proteïnes HMG (*high mobility group*). Com les altres proteïnes d'aquest grup, el TFAM pot unir-se a l'ADNmt, desenrotllar-lo i torçar-lo (Fisher et al. 1992) (Figura 1). Per això, el TFAM interacciona a través dels seus dominis HMG-box amb el promotor de cada una de les cadenes de l'ADNmt i simultàniament estimula la transcripció mitjançant el domini carboxiterminal (Dairaghi et al. 1995a). El TFAM té una afinitat diferent pels dos promotors de l'ADNmt: en té més pel P_L que pel P_H (Topper et al. 1989; Dairaghi et al. 1995b; Falkenberg et al. 2002; Fernandez-Silva et al. 2003). D'aquesta manera, la regulació de la replicació i transcripció de l'ADNmt depèn dels nivells de TFAM. Que hi hagi uns nivells de

TFAM baixos és suficient per promoure la replicació de l'ADNmt, ja que, a part de promoure l'expressió dels productes de la cadena lleugera, permet formar molècules d'ARN que donen lloc als encebadors necessaris per començar la replicació de l'ADNmt. En canvi, són necessaris nivells més alts de TFAM perquè es pugui unir al P_H, i, per tant, s'indueixi l'expressió dels ARNm que codifiquen per les proteïnes mitocondrials (Dairaghi et al. 1995b).

Factors de transcripció mitocondrial B (TFBM)

Els TFBM són factors implicats en el començament de la transcripció mitocondrial, encara que no sembla que siguin essencials per al procés d'elongació (Falkenberg et al. 2002). Han estat descrites dues isoformes de TFBM (TFB1M i TFB2M), les quals presenten una activitat transcripcional ben diferent, ja que l'activitat del TFB2M supera en més de dos ordres de magnitud la del TFB1M (McCulloch et al. 2003). Les dues isoformes s'uneixen a la POLRMT i formen un heterodímer que interacciona amb el TFAM unit a la seqüència reguladora del promotor. D'aquesta manera, sembla que la funció dels TFBM consisteix a apropar la POLRMT al promotor que està desenrotllat per l'acció del TFAM (Falkenberg et al. 2002).

Factor de terminació de la transcripció mitocondrial (mTERF)

L'mTERF, que s'uneix a l'ADNmt de manera monomèrica (Kruse et al. 1989; Fernandez-Silva et al. 1997), interacciona amb la POLRMT una vegada que han estat transcrits únicament els dos ARNr codificats per la cadena pesant i, en conseqüència, la transcripció acaba (Fernandez-Silva et al. 2003). Aquesta interrupció de la transcripció té la funció de mantenir la relació entre els ARNr i els ARN missatgers (ARNm) perquè la traducció es faci en condicions òptimes (Fernandez-Silva et al. 2003).

Replicació de l'ADNmt

La replicació de l'ADNmt té lloc, principalment, a la darrera part de la fase S i a la fase G₂ del cicle cel·lular, encara que podria esdevenir en qualsevol moment del cicle (Bogenhagen et al. 1977). El model més acceptat que descriu la replicació de l'ADNmt es basa en un mecanisme de desplaçament asincrònic a partir de dos orígens de replicació independents. El procés començaria a l'O_H, a partir del qual l'ADN polimerasa mitocondrial (ADNpol γ) faria la còpia complementària de la cadena

lleugera, és a dir, sintetitzaria la cadena pesant. Quan la replicació avança fins al punt en què l'O_L queda exposat, la replicació començaria en sentit oposat a l'anterior i es formaria la còpia de la cadena lleugera (Shadel et al. 1997; Clayton 2003).

Perquè pugui començar la replicació són imprescindibles petites molècules d'ARN que actuen com a encebadors i que es formen mitjançant el processament de l'ARN precursor generat durant la transcripció de la cadena lleugera (Chang et al. 1987; Moraes 2001). Així doncs, la replicació i transcripció de l'ADNmt són dos processos associats i, per tant, els factors reguladors controlen ambdós processos (Fernandez-Silva et al. 2003). Addicionalment, l'ADNpoly necessita molts altres factors per poder funcionar adequadament, entre els quals cal destacar una helicasa mitocondrial dependent de l'ATP que desenrotlla l'ADNmt i la proteïna mtSSB, que interacciona amb l'ADNmt de cadena senzilla i incrementa l'activitat i la fidelitat de l'ADNpoly (Roberti et al. 1996; Korhonen et al. 2003).

1.1.3. Regulació de la funció i biogènesi mitocondrials

1.1.3.1. Funció mitocondrial i estrès oxidatiu

La producció mitocondrial d'energia és un procés que és, a la vegada, necessari i perillós per a la integritat dels mitocondris i de les cèl·lules. El motiu d'aquesta contradicció aparent, coneguda com «la paradoxa de l'oxigen» (Davies 1995), és la producció mitocondrial de radicals lliures, entre els quals destaquen les espècies reactives d'oxigen (ROS) que es formen de manera natural durant el procés de respiració mitocondrial. De fet, entre l'1% i el 5% de l'oxigen consumit pel mitocondri es converteix en ROS en condicions fisiològiques normals (Chance et al. 1979). Els radicals lliures són unes espècies químiques que tenen una vida mitjana molt curta, són molt inestables i altament reactives, ja que tenen un electró desaparellat que ataca zones de les molècules de l'entorn que tenen una elevada densitat electrònica, la qual cosa en provoca l'oxidació. La formació de radicals lliures està localitzada, principalment, en els complexos I i III de la CRM, els quals produeixen majoritàriament ió superòxid ($\bullet\text{O}_2^-$) (Figura 2). Això a banda, el ió superòxid per dismutació espontània o per acció de la superòxid dismutasa (SOD) es pot convertir en peròxid d'hidrogen (H_2O_2), que a continuació es pot descompondre en radical hidroxil ($\bullet\text{OH}$), el radical lliure d'hidrogen més reactiu i lesiu. Per part seva, el ió superòxid pot donar lloc a radicals lliures de

nitrogen, ja que quan reacciona amb el NO es forma el radical lliure peroxinitrit ($\bullet\text{ONOO}^-$) (Koppenol 1998).

Per fer front a les ROS, l'organisme disposa de sistemes de defensa antioxidants enzimàtics i no enzimàtics. Entre els sistemes enzimàtics destaca la catalasa, la SOD, la glutatió peroxidasa (GPx) i la glutatió reductasa (GR) i, entre els no enzimàtics, l'àcid lipòic, el glutatió i les vitamines C i E. Quan la producció de ROS supera la capacitat antioxidant de la cèl·lula es produeix el que es coneix com una situació d'estrès oxidatiu. Les ROS interaccionen amb les diferents molècules biològiques (lípid, proteïnes i àcids nucleics) i quan en modifiquen l'estructura i funció es provoca dany oxidatiu (Droge 2002). L'ADNmt és més susceptible de patir dany oxidatiu que l'ADNn (Richter et al. 1988) perquè, per la proximitat que té respecte de la CRM, està més exposat als nivells elevats de ROS generats durant la respiració. A més a més, a diferència de l'ADNn, l'ADNmt no té histones protectores i la capacitat que té de reparació és molt limitada. Precisament, l'acumulació de dany oxidatiu en els mitocondris és la responsable principal de la disfunció mitocondrial i està relacionada amb el desenvolupament de moltes patologies humanes, entre les quals les malalties neurodegeneratives, les cardiovasculars, la diabetis i la degeneració acumulativa associada a l'envelliment (Afanas'ev 2007).

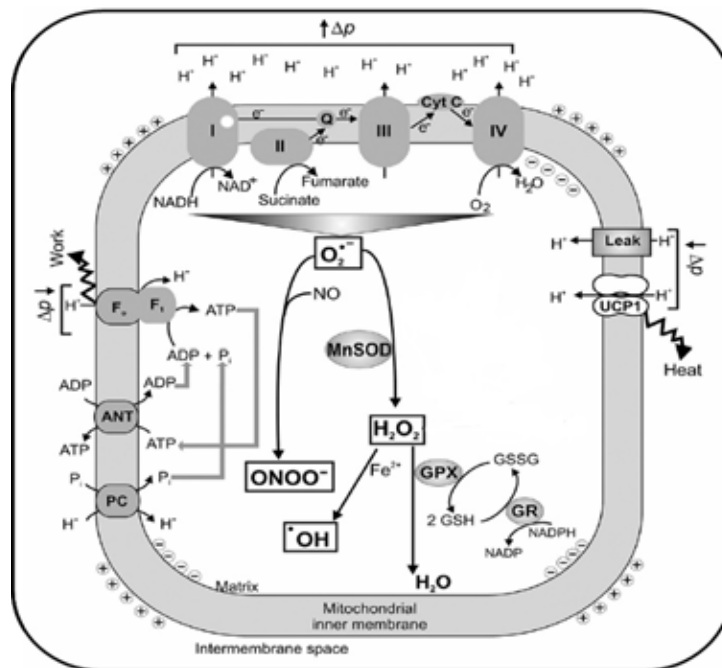


Figura 2. Representació esquemàtica de la formació de radicals lliures associada al funcionament de la CRM i dels sistemes antioxidants principals (adaptada d'Echtay 2007)

Encara que tradicionalment hom hagi considerat que les ROS eren exclusivament espècies nocives per a l'organisme, a partir dels anys vuitanta començaren a suggerir que les ROS tenien una funció doble, ja que també podrien actuar de segons missatgers en diverses vies de senyalització (Hensley et al. 2000; Thannickal et al. 2000), entre les quals volem destacar el procés de biogènesi mitocondrial (Figura 3). De tota manera, el mecanisme exacte pel qual les ROS modulen la biogènesi mitocondrial no està completament establert, però sembla que el seu efecte depèn del nivell d'estrès oxidatiu i de la persistència d'aquesta situació. Per una banda, ha estat comprovat amb rates que l'estrès oxidatiu augmenta l'activitat de l'NRF1, l'expressió del TFAM i estimula la replicació de l'ADNmt. Hi ha estudis *in vitro* que demostren que l'estrès oxidatiu activa la biogènesi mitocondrial mitjançant l'acció de l'NRF1 associada a l'activació de la via fosfatidil inositol 3 cinasa/Ser-Thr cinasa A (PI3K/AKT) (Suliman et al. 2003), la qual cosa podríem atribuir a la inhibició per oxidació del PTEN, un regulador negatiu d'aquesta via (Leslie et al. 2003). De fet, el tractament amb antioxidants inhibeix l'augment de la biogènesi associat a l'estrès oxidatiu (Viña et al. 2009). Per altra banda, hem vist l'efecte contrari de l'estrès oxidatiu en altres models d'estudi. Rosegadors amb obesitat genètica o induïda per la dieta tenen uns nivells de PGC-1 α , NRF1 i TFAM inferiors als dels animals control, i això és a conseqüència del descens en l'expressió de l'òxid nítric sintasa endotelial (eNOS) (Valerio et al. 2006), mentre que l'augment en l'expressió de l'eNOS promou la biogènesi mitocondrial (Nisoli et al. 2005). Això es podria explicar perquè, en una primera fase d'estrès oxidatiu lleu, l'organisme hi pot fer front activant els mecanismes antioxidants, però, quan la situació s'agreuja, els sistemes antioxidants poden resultar insuficients i el dany oxidatiu augmentaria (Thomas-Moya et al. 2007).

La ingesta de dietes riques en calories i greixos està directament relacionada amb el desenvolupament de l'obesitat i representa, a més a més, una disponibilitat elevada de substrats energètics per als teixits que està associada a la generació d'estrès oxidatiu (Rudich et al. 2007). L'excés de substrats oxidables fa que arribi més poder reductor a la cadena de transport d'electrons, la qual cosa incrementa la probabilitat que es produeixi una transferència accidental d'un electró a una molècula d'oxigen, acció que faria augmentar la producció de radicals lliures. És per això que habitualment l'obesitat dietètica ha estat emprada com una eina d'inducció d'estrès oxidatiu.

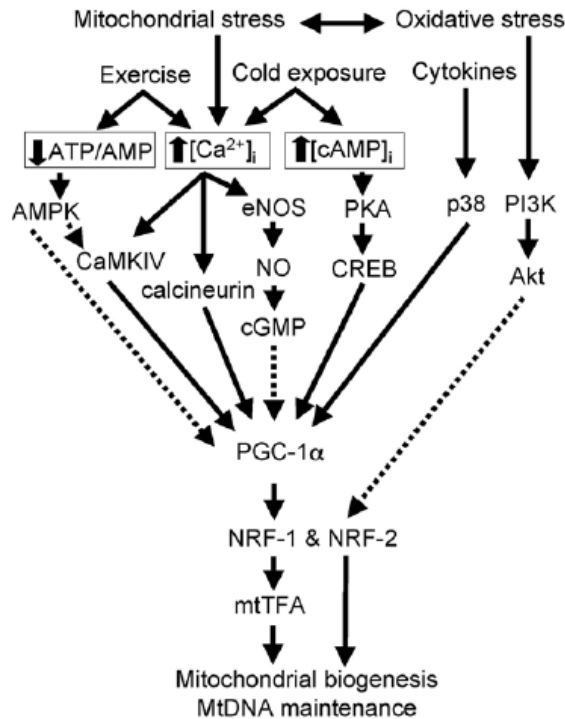


Figura 3. Vies de transducció de senyals implicats en la biogènesi mitocondrial a cèl·lules de mamífers i els factors que les modulen (Lee et al. 2005)

1.1.3.2. Diferències de sexe en la funció mitocondrial

El nostre grup d'investigació ha fet estudis previs que posen de manifest que hi ha un dimorfisme sexual en la morfologia i funció mitocondrials. Aquest dimorfisme segueix un patró semblant en teixits diversos, com el fetge, el TAM, el múscul o el cervell, i en tots els casos les rates femella presenten mitocondris més diferenciats que els mascles, la qual cosa es tradueix en més capacitat oxidativa mitocondrial a les femelles (Colom et al. 2007a; Colom et al. 2007b; Valle et al. 2007a; Valle et al. 2007b; Guevara et al. 2009).

A més a més, en el cas del TAM, hom ha vist que els nivells de proteïna desacobladora 1 (UCP1) —el marcador de diferenciació mitocondrial més important d'aquest teixit— també són més elevats en les rates femella que en els mascles. Aquests resultats van en el mateix sentit que els estudis de morfologia mitocondrial, ja que han permès comprovar que el TAM de les femelles presenta mitocondris més grossos i amb més densitat de crestes mitocondrials que el dels mascles (Rodríguez-Cuenca et al. 2002). Aquestes diferències de sexe poden ser conseqüència d'una regulació diferencial del

cicle de creixement mitocondrial (Justo et al. 2005) i expliquen que les rates femella tinguin més capacitat termogènica que els mascles (Quevedo et al. 1998). Encara que sembla evident que les hormones sexuals tenen un paper clau en les diferències de sexe observades en el nivell mitocondrial, no podem deixar de banda que el regulador principal del funcionament del TAM és la noradrenalina (Lafontan et al. 1997), i la seva via de senyalització també mostra un clar dimorfisme sexual. Les femelles exhibeixen una expressió preferencial del β_3 -AR (receptor adrenèrgic β_3) enfront de l' α_2 -AR, i més sensibilitat del β_3 -AR a la noradrenalina (Rodríguez-Cuenca et al. 2002). Tenint en compte que els β_3 -AR estan acoblats a l'activitat adenilat ciclase i els α_2 -ARs inhibeixen l'activitat d'aquest enzim (Lafontan et al. 1995), les diferències de sexe en la senyalització de la noradrenalina han estat relacionades amb la major diferenciació mitocondrial i les activitats termogènica i lipolítica de les femelles (Rodríguez-Cuenca et al. 2002).

El dimorfisme sexual a nivell mitocondrial no es limita a la capacitat oxidativa, sinó que arriba a l'estrès oxidatiu. En general, la incidència de dany oxidatiu és inferior en les femelles que en els mascles, la qual cosa ha estat atribuïda a uns nivells més elevats de defenses antioxidants (activitat SOD i GPx), ja que en alguns casos la producció de ROS de les femelles fins i tot supera la dels mascles (Colom et al. 2007b; Valle et al. 2007b; Gomez-Perez et al. 2008).

La funció dels estrògens

Els estrògens tenen un protagonisme important en la funció i biogènesi mitocondrials, ja que regulen l'expressió coordinada dels genomes nuclear i mitocondrial. Hi ha molts estudis que demostren que els estrògens indueixen l'expressió de les proteïnes de la CRM codificades per l'ADNn (Stirone et al. 2005; Irwin et al. 2008). Un model àmpliament acceptat per intentar explicar el mecanisme d'acció dels estrògens es basa en l'activació del TFAM mitjançant l'augment de l'expressió dels NRF (Mattingly et al. 2008; Chen et al. 2009). Segons aquest model, els estrògens incrementen la unió dels receptors d'estrògens (ER) a l'element de resposta a estrògens (ERE), que està situat en el promotor dels NRF i activa l'expressió d'aquests gens, i desencadena la via de senyalització implicada en la biogènesi mitocondrial. De tota manera, sembla que aquest no és l'únic punt de la cascada susceptible de ser regulat pels estrògens, ja que

hom ha vist que l'expressió del PGC-1 α augmenta mitjançant la via de l'ER β (Hsieh et al. 2005).

En presència de nivells alts d'estrògens també augmenta la replicació i transcripció de l'ADNmt a diversos teixits, com el fetge i el teixit adipós (Chen et al. 1996; Ye et al. 2005). Això pot ser provocat per l'increment de l'expressió de gens com el TFAM, mitjançant l'efecte dels estrògens sobre el genoma nuclear, però també gràcies a l'acció directa dels estrògens sobre el genoma mitocondrial. De fet, la localització d'ER a nivell mitocondrial (Monje et al. 2001; Stirone et al. 2005; Milanesi et al. 2008), juntament amb la presència d'alguns ERE en la regió *D-loop* de l'ADNmt (Sekeris 1990; Demonacos et al. 1996), fan que el genoma mitocondrial sigui considerat una de les dianes importants dels estrògens. Així, els estrògens activen la transcripció de l'ADNmt en funció de la dosi i del temps mitjançant la unió dels ER als ERE mitocondrials (Chen et al. 2004). Aquests efectes són blocats mitjançant l'ús d'antagonistes dels ER o silenciant l'ER β (Chau et al. 1998; Chen et al. 2004).

A part de la biogènesi mitocondrial, els estrògens també regulen l'estat redox cel·lular. El paper dels estrògens en aquest context no es limita solament a la funció antioxidant atribuïda a l'estructura fenòlica (Ruiz-Larrea et al. 1997), sinó que s'estén sobre l'expressió d'enzims antioxidants, com la SOD o la GPx. A diferència dels gens implicats en la biogènesi mitocondrial, els gens que codifiquen per aquests enzims antioxidants no presenten ERE en els promotors, per la qual cosa, en aquest cas, l'acció dels estrògens seria «no genètica». Concretament, l'expressió de la SOD i de la GPx augmenta quan hi ha nivells elevats d'estrògens mitjançant la via de senyalització de les MAP cinases (MAPK) (Borras et al. 2005). Usant models d'estudi diferents, hom ha vist que la unió dels estrògens als receptors cel·lulars activa ràpidament les MAPK (Bi et al. 2000; Song et al. 2002) i, en conseqüència, l'I κ B —que actua d'inhibidor del factor nuclear kappa B (NF κ B)— es fosforila i degrada. Aleshores, l'NF κ B entra en el nucli i activa l'expressió de gens que contenen seqüències d'unió a l'NF κ B en els promotors, entre els quals hem de destacar el gen que codifica per a la SOD i per a la GPx (Das et al. 1995; Zhou et al. 2001). A més a més, no podem descartar altres mecanismes d'acció dels estrògens sobre l'expressió dels enzims antioxidants; per exemple, mitjançant la cascada de senyalització de l'NRF2 (Tamasi et al. 2004).

Tant les diferències mitocondrials com el possible efecte protector dels estrògens han estat relacionats amb una esperança de vida més llarga de les femelles de moltes espècies que dels mascles (Viña et al. 2005; Viña et al. 2006).

1.2. Funció mitocondrial i sensibilitat a la insulina

La insulina és una hormona polipeptídica sintetitzada pels illots de Langerhans del pàncrees en resposta a l'augment de la concentració sanguínia de sucres o aminoàcids. La funció principal de la insulina és fer disminuir els nivells de glucosa sanguínia; per tant, entre altres efectes, promou la captació de glucosa per part del múscul, la conversió de glucosa en glicogen en el fetge i inhibeix la lipòlisi en el teixit adipós. En conseqüència, la insulina és considerada la principal hormona anabolitzant de l'organisme i, per això, també rep el nom d'hormona hipoglucèmica.

1.2.1. Via de senyalització de la insulina

Receptor de la insulina (IR)

La insulina comença a actuar mitjançant la unió a l'IR (Figura 4). Aquest receptor és un tetràmer format per dos proreceptors, cada un dels quals està constituït per una subunitat α i una subunitat β que s'uneixen mitjançant ponts disulfur. Les subunitats α representen el domini extracel·lular de l'IR i poden unir-se a la insulina, mentre que la part transmembrana i el domini intracel·lular d'IR estan formats per les subunitats β , les quals tenen activitat tirosina-cinasa. La unió de la insulina a les subunitats α activa l'autofosforilació de l'IR en residus de Tyr, la qual cosa desencadena la cascada de senyalització de la insulina (Virkamaki et al. 1999). L'afinitat de la insulina respecte del seu receptor pot variar en funció del teixit, ja que hi ha dues isoformes de l'IR (l'IRa i l'IRb) que estan formades per l'empalmament alternatiu en funció del teixit (Frasca et al. 1999).

Substrats del receptor de la insulina (IRS)

L'autofosforilació de l'IR en residus de Tyr provoca l'aproximació i la fosforilació consegüent en residus de Tyr dels IRS. La immunoprecipitació amb anticossos anti-fosfo-Tyr aplicada a hepatòcits estimulats amb insulina va revelar l'existència del

primer IRS descrit, el IRS1 (White et al. 1985; Sun et al. 1991). Hi ha altres proteïnes que poden interaccionar amb l'IR, però la major part de la senyalització de la insulina és transmesa mitjançant la fosforilació del IRS1 i del seu homòleg IRS2 (White 2003). Tot i que ambdós IRS estan implicats en l'homeòstasi de la glucosa, sembla que cada un pot tenir unes funcions concretes en funció del teixit de què es tracti (Tamemoto et al. 1994; Valverde et al. 1998; Schubert et al. 2003).

Les proteïnes IRS tenen un domini amb capacitat d'unió a residus de Tyr fosforilats (PTB) que són adjacents a la regió aminoterminal. El domini PTB s'uneix directament a la regió fosforilada dels receptors actius de la insulina, dels factors de creixement insulínics o d'interleuquines (White 2003). La regió carboxitèrminal del IRS1 o del IRS2 no presenten activitat catalítica intrínseca, però contenen molts residus de Ser i Tyr. La fosforilació d'aquests residus de Tyr per part de l'IR provoca l'activació dels IRS induint l'associació d'enzims com el PI3K als IRS (Virkamaki et al. 1999).

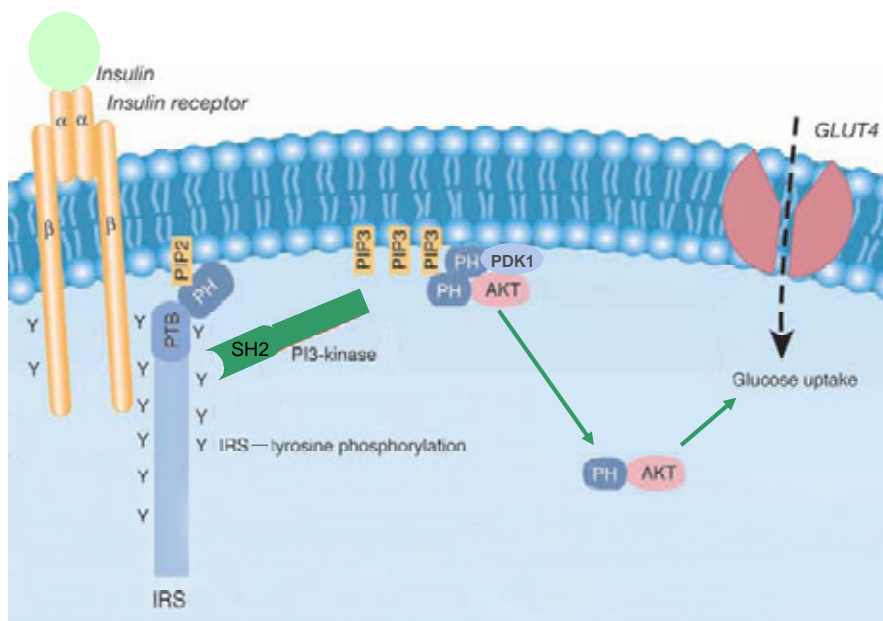


Figura 4. Via de senyalització de la insulina (adaptada de Lowell et al. 2005)

Fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K)

El PI3K és un heterodímer format per una subunitat reguladora (p85) i una subunitat catalítica (p110). Quan la subunitat reguladora interacciona amb el IRS fosforilat en residus de Tyr, la subunitat catalítica s'activa; aleshores, el PI3K transforma els lípids de la membrana plasmàtica fosfatidilinositol bifosfat (PIP₂) en fosfatidilinositol trifosfat (PIP₃) (Hawkins et al. 1992; Cantrell 2001). La localització de PIP₃ a la membrana

cel·lular fa que s'acumulin proteïnes amb dominis PH a les zones d'activació del PI3K, gràcies que s'uneix de manera directa amb el PIP₃. Entre aquestes proteïnes cal destacar l'AKT (també coneguda com la proteïna cinasa B, PKB) i la cinasa dependent de fosfatidil inositol 1 (PDK1) (Lawlor et al. 2001).

Ser-Thr cinasa A (AKT)

L'AKT és un dels elements clau en la transmissió del senyal del PI3K. L'AKT pertany a la família de cinases coneguda com a AGC, la qual també inclou la proteïna cinasa dependent d'AMPc (PKA), la proteïna cinasa dependent de GMPc (PKG) i la proteïna cinasa C (PKC), i totes tres donen nom a la família. Hi ha tres isoformes de la proteïna AKT (l'AKT1, l'AKT2 i l'AKT3) i cada una té unes funcions específiques. Mentre que l'AKT2 és la més important en la via de senyalització de la insulina (Cho et al. 2001a; Garofalo et al. 2003), l'AKT1 està implicada en el creixement corporal i en la diferenciació dels adipòcits (Cho et al. 2001b; Yun et al. 2008) i l'AKT3 participa en el desenvolupament del cervell (Tschopp et al. 2005).

La proteïna AKT s'activa quan es fosforila en residus crítics. El punt més important de fosforilació de l'AKT és la Thr308, situada a la regió d'activació (Alessi et al. 1996; Bellacosa et al. 1998). Aquesta Thr és fosforilada per l'acció de la PDK1, de manera que l'associació d'ambdues proteïnes al PIP₃ n'afavoreix l'aproximació i, per tant, l'activació de l'AKT. L'altre punt de fosforilació de l'AKT és a la regió hidrofòbica de la proteïna i, encara que no està tan implicada en l'activació de l'enzim, sembla que té la funció de facilitar la interacció amb els seus substrats (Lawlor et al. 2001).

L'activació de l'AKT provoca l'alliberament de la membrana plasmàtica i la fosforilació consegüent de proteïnes citosòliques i nuclears per part de l'enzim. El conjunt de dianes de l'AKT és ampli i inclou proteïnes implicades en el cicle cel·lular, l'apoptosi i la resposta a la insulina (Cantrell 2001). En referència a la resposta a la insulina, cal destacar que en el fetge l'AKT fosforila i inactiva la glicogen sintasa cinasa 3, de manera que deixa d'inhibir la glicogen sintasa i permet que augmenti la formació de glicogen (Cross et al. 1995; van Weeren et al. 1998). A més a més, l'AKT està implicada en la captació de glucosa dependent d'insulina que es duu a terme mitjançant el transportador de glucosa de tipus 4 (Glut-4) al múscul i al teixit adipós. En resposta a la insulina, augmenta l'associació de l'AKT2 a les vesícules que contenen el Glut-4

(Calera et al. 1998; Kupriyanova et al. 1999) i, en conseqüència, es fosforilen i activen proteïnes implicades en la exocitosi vesicular, la qual cosa desencadena la translocació del transportador a la membrana plasmàtica (van Dam et al. 2005; McCarthy et al. 2007).

1.2.2. Resistència a la insulina

Definim la resistència a la insulina com l'alteració de la resposta tissular a l'acció d'aquesta hormona. En una primera etapa del procés de resistència a la insulina, el pàncrees hi respon augmentant la secreció d'insulina i, per tant, els nivells plasmàtics (hiperinsulinèmia). Tot i això, els nivells d'insulina en sang poden ser insuficients i, en aquest context, disminueix la captació de glucosa per part del múscul, augmenta la gluconeogènesi hepàtica i es deixa d'inhibir la lipòlisi en el teixit adipós, entre altres efectes. Amb el temps, s'acaba instaurant la hiperglucèmia circulant i la diabetis mellitus de tipus 2.

No està clar quin és el mecanisme que indueix els efectes de la insulina. És interessant destacar que la síntesi de lipoproteïnes de molt baixa densitat (VLDL) per part del fetge no queda blocada, sinó que augmenta a conseqüència de la resistència a la insulina. Aquest fet, que és interpretat com un mecanisme encaminat a reduir els efectes de la deposició hepàtica de lípids, acaba causant hipertrigliceridèmia circulant (Marra et al. 2008). Cal ressaltar que, en una situació de resistència a la insulina pura (animals que no expressen l'IR al fetge), la hiperglucèmia circulant va acompanyada d'una baixa hipertrigliceridèmia (Michael et al. 2000). D'aquests estudis se'n desprèn la idea que la insulina manifesta els efectes que té sobre la via glucogènica i lipogènica mitjançant la unió a l'IR, però hi ha d'haver un punt de regulació posterior, diferent en cada cas, que faci que la resistència a la insulina solament afecti la via glucogènica i no la lipogènica. Aquest efecte és conegut com la «paradoxa de la resistència a la insulina» (Brown et al. 2008).

D'ençà que va ser descrita per primera vegada a l'any 1988, la resistència a la insulina ha estat considerada un tret rellevant en la patofisiologia de la síndrome metabòlica (Reaven 1988; Bruce et al. 2010), que també inclou altres factors, com són la hipertensió i la dislipèmia (baixada del nivell de les lipoproteïnes d'alta densitat i

augment de les VLDL). Tots constitueixen factors de risc de les malalties cardiovasculars.

Tradicionalment ha estat considerat que l'obesitat, concretament la que duu associada l'acumulació de greix visceral, és l'element desencadenant de la resistència a la insulina. No obstant això, no totes les persones que desenvolupen aquestes alteracions són obeses. De fet, hom considera que l'etiologia de la síndrome metabòlica és multifactorial, ja que, a més de la genètica o dels trastorns alimentaris, la disfunció mitocondrial i l'entorn hormonal poden ser determinants (Bruce et al. 2010).

1.2.2.1. L'obesitat com a factor etiològic

De cada vegada hi ha més estudis que indiquen que la capacitat d'expansió limitada del teixit adipós —i no tant l'obesitat en si— és un factor clau en la progressió de patologies com la resistència a la insulina (Virtue et al. 2010). De fet, aquesta idea constitueix la base de l'anomenada hipòtesi d'expansió del teixit adipós, que veiem resumida a la figura 5 i que explicam tot seguit.

En una situació d'obesitat, els adipòcits augmenten de mida (s'hipertrofen), la qual cosa en provoca l'alteració del funcionament normal. Això té com a conseqüència que, en l'estat postprandial, la capacitat que té la insulina d'inhibir la lipòlisi en el teixit adipós queda reduïda i també falla la captació de lípids des de la circulació. Com a resultat, augmenten els nivells circulants d'àcids grassos i triacilglicèrids i també el seu flux cap a altres teixits, com el fetge, els músculs o el pàncrees (Frayn 2002). El metabolisme oxidatiu d'aquests teixits augmenta en resposta a l'arribada excessiva de lípids com a mecanisme compensatori (Savage et al. 2005), encara que, si la situació es perllonga, aquesta estratègia és insuficient. Al final, la deposició de lípids en els teixits no destinats a aquesta funció n'acaba alterant el funcionament normal. Aquesta situació és coneguda com a lipotoxicitat (Slawik et al. 2006; van Herpen et al. 2008). Entre les alteracions associades a la lipotoxicitat hem de destacar la resistència a la insulina.

Un dels primers mecanismes proposats per intentar explicar el procés pel qual l'entrada excessiva de lípids en els teixits acaba induint resistència a la insulina va ser descrit els anys seixanta (Randle et al. 1964; Randle et al. 1965). Segons aquest model, els àcids grassos intracel·lulars inhibeixen la fosfofructocinasa, la qual cosa fa augmentar la

concentració de glucosa i, per tant, en redueix la captació. En qualsevol cas, aquest possible mecanisme no va tenir el suport dels resultats posteriors (Roden et al. 1996; Griffin et al. 1999) i de cada dia té més força la hipòtesi que destaca que la disfunció mitocondrial és una de les causes de resistència a la insulina.

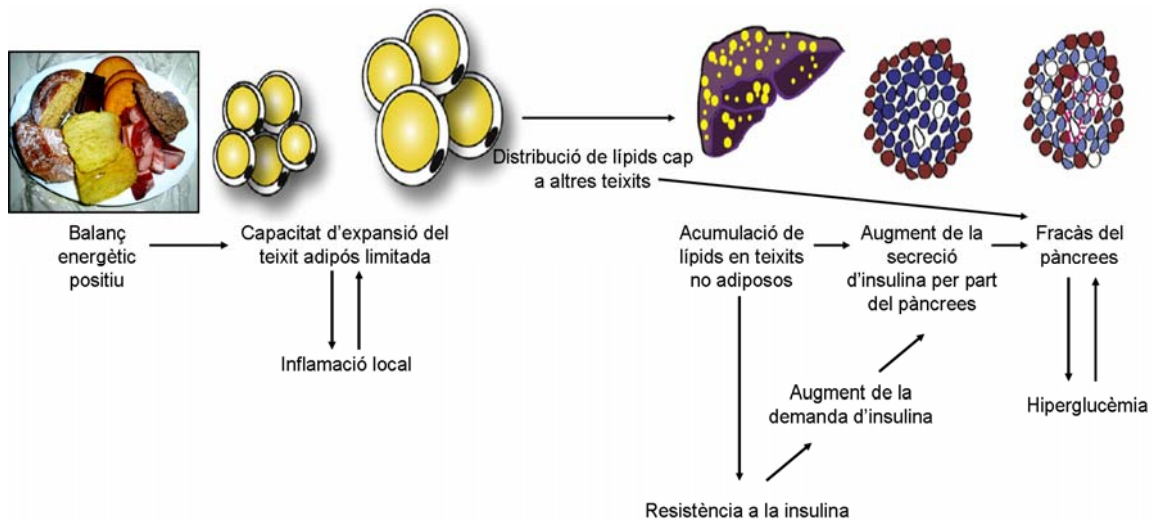


Figura 5. Possible mecanisme segons el qual el balanç energètic positiu indueix diabetis de tipus 2 (adaptada de Virtue et al. 2010)

1.2.2.2. Disfunció mitocondrial i resistència a la insulina

Amb l'obesitat, incrementa la β -oxidació —que pot saturar la CRM—, la producció de ROS i el dany oxidatiu, així com els nivells intracel·lulars de metabòlits dels àcids grassos, com el diacilglicerol i els acil-CoA. Tant aquestes molècules com les ROS acaben activant cinases de Ser que fosforilen els IRS en residus crítics pel seu funcionament (com la Ser³⁰⁷), la qual cosa n'inhibeix la fosforilació en els residus de Tyr (Figura 6). D'aquesta manera, es redueix la senyalització de la insulina i es desactiva la via PI3K/AKT (Shulman 2000; Lowell et al. 2005; Fridlyand et al. 2006). Entre les cinases inhibidores cal destacar les cinasa amino terminal c-jun (JNK). Hom ha proposat que concretament la isoforma JNK1 és el nexe de connexió entre l'obesitat i la resistència a la insulina en teixits com el fetge (Hirosumi et al. 2002; Sabio et al. 2008). Encara que aquesta possible relació entre l'obesitat, la disfunció mitocondrial i la resistència a la insulina és de cada vegada més evident en teixits com el múscul o el fetge (Morino et al. 2005; Beyer et al. 2008), hi ha altres estudis que demostren que la resistència a la insulina pot aparèixer independentment de la disfunció mitocondrial

(Flamment et al. 2008), per la qual cosa no podem descartar que hi estiguin implicats altres mecanismes.

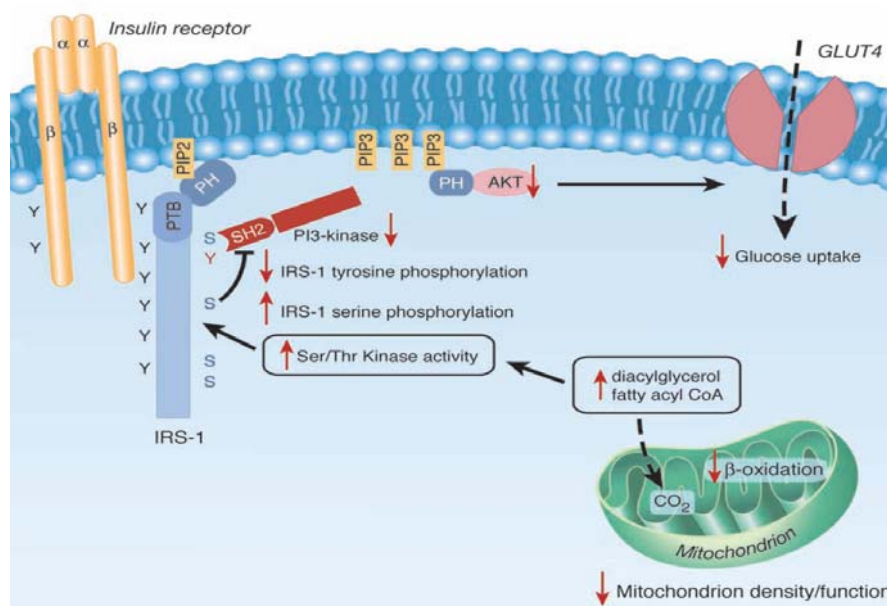


Figura 6. Possible mecanisme pel qual la disfunció mitocondrial induïx resistència a la insulina (Lowell et al. 2005)

1.2.2.3. Adipoquines i resistència a la insulina

El teixit adipós constitueix no solament un reservori d'energia, sinó que també funciona com a òrgan endocrí, ja que secreta molècules bioactives (anomenades adipoquines), que estan implicades en molts de processos, com el control de la ingesta i del balanç energètic, el metabolisme glucídic i lipídic, la coagulació, angiogènesi, pressió sanguínia i la sensibilitat a la insulina (Guerre-Millo 2004). Les funcions de les principals adipoquines han estat revisades recentment en treballs diversos (Rabe et al. 2008; Marra et al. 2009) i les resumim a la figura 7.

Els canvis en la producció d'adipoquines associats a l'obesitat afavoreixen el desenvolupament de la resistència a la insulina i les complicacions associades. Entre les adipoquines que presenten la funció/secreció alterada durant l'obesitat, i que estan implicades en la sensibilitat a la insulina, cal destacar la leptina, l'adiponectina, la resistina, el factor de necrosi tumoral α (TNF- α) i la interleucina-6 (IL-6).

La secreció de resistina, de TNF- α i d'IL-6 augmenta durant l'obesitat. En conseqüència, s'inhibeix la formació de glicogen hepàtic, augmenta la producció de glucosa hepàtica —la qual cosa bloca la captació i el metabolisme dels àcids grassos per part del múscul—, s'activen cinases i fosfatases que bloquen la transmissió del senyal de la insulina a nivell del IRS i es redueix l'expressió de l'IR als teixits perifèrics (Valverde et al. 2005; McTernan et al. 2006; Gnacinska et al. 2009). Addicionalment, han estat relacionats nivells elevats d'IL-6 amb la inhibició de la secreció d'adiponectina i, per tant, amb la reducció dels efectes potenciadors de la sensibilitat a la insulina atribuïts a aquesta adipoquina (Kadowaki et al. 2006). Encara que la síntesi de leptina fins i tot pot augmentar durant l'obesitat, és habitual observar un perfil de resistència a la leptina, ja que, en individus obesos, aquesta adipoquina deixa d'incloure els efectes anorèctics que provoca en condicions control (Enriori et al. 2006).

El paper de totes aquestes adipoquines en la progressió de la resistència a la insulina reforça la hipòtesi d'expansió del teixit adipós, ja que la seva secreció no depèn solament de la massa dels dipòsits de greix, sinó també de la mida dels adipòcits. De fet, com a resultat de la hipertròfia dels adipòcits, augmenta especialment la producció de les adipoquines proinflamàtores (Skurk et al. 2007).

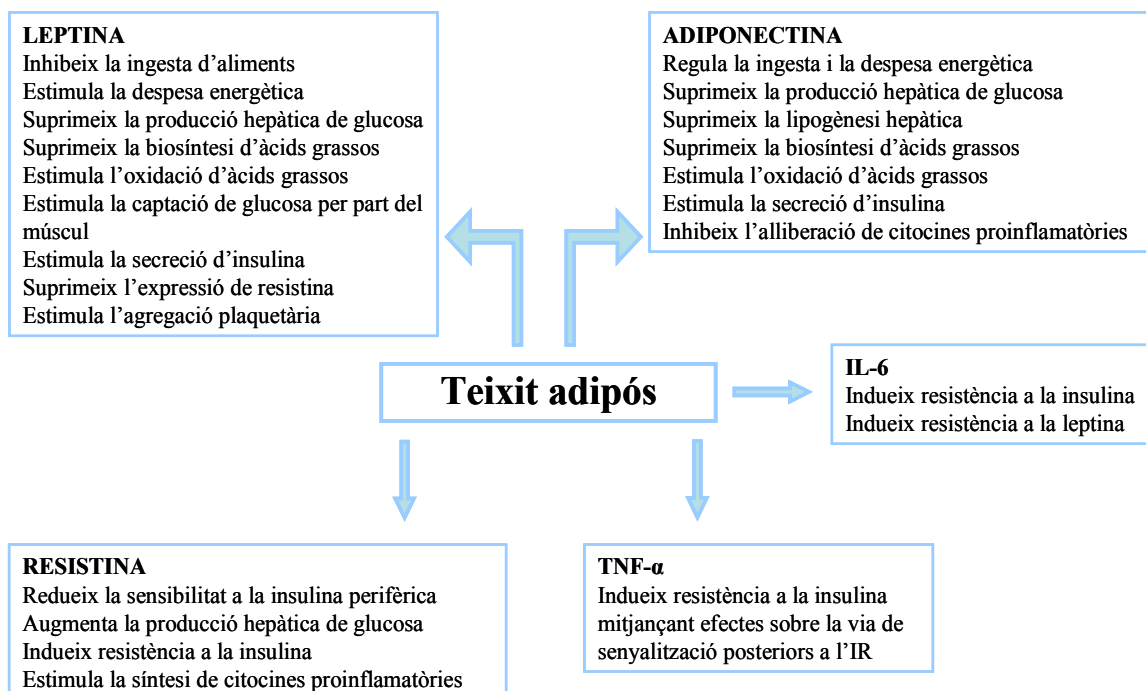


Figura 7. Principals adipoquines produïdes pel teixit adipós i les seves funcions més importants

1.3. Paper metabòlic del teixit adipós marró i del fetge

El TAM és un òrgan central del metabolisme energètic de mamífers petits o nounats, ja que té la funció principal de mantenir la temperatura corporal mitjançant el procés de la termogènesi adaptativa. El TAM està distribuït en àrees diferents de l'organisme. La concentració més gran d'adipòcits marrons està localitzada a la regió toràcica, on podem distingir els dipòsits següents: interescapular, subescapular, cervical, axil·lar, pericardíac i periaòrtic. També són importants els dipòsits perianals i els que estan immersos en el teixit adipós blanc (Cannon et al. 2004). Des del punt de vista morfològic, els adipòcits marrons presenten una geometria polièdrica, moltes vacuoles repartides pel citoplasma, un nucli esfèric situat a la regió central i un contingut mitocondrial elevat (Cinti 2005). Precisament, la funció termogènica del TAM recau en la presència d'una densitat elevada de mitocondris que normalment estan desacoblats per la localització de la UCP1 a la membrana interna mitocondrial (Nicholls et al. 1986).

La UCP1 és una proteïna que té sis segments transmembrana, amb ambdós extrems aminoterminal i carboxiterminal localitzats a l'espai intermembranal, que s'activa en forma de dímer. L'activitat de la UCP1 és sensible a variacions del metabolisme cel·lular, ja que és inhibida per nucleòtids de purina i activada per la presència d'àcids grassos, els quals són els combustibles principals que mantenen la capacitat termogènica del teixit (Nicholls 1974; Cannon et al. 2004).

La funció de la proteïna UCP1 consisteix a dissipar el gradient protònic de l'espai intermembranós generat pel funcionament de la cadena respiratòria mitocondrial. Com a conseqüència, el flux de protons queda reduït a través de l'ATP sintasa, minva la formació d'ATP i l'energia generada en el gradient electroquímic és dissipada en forma de calor (Nicholls et al. 1986). A part del fred, una ingesta energètica elevada també activa la funció termogènica del TAM (termogènesi induïda per la dieta) i desencadena la despesa d'energia i, d'aquesta manera, controla l'increment del pes corporal. De fet, durant l'obesitat dietètica augmenta la massa, el nombre de cèl·lules, l'activitat d'enzims respiratoris, la capacitat d'unió dels nucleòtids de purina i el recanvi de noradrenalina del TAM (Brooks et al. 1980; Tulp et al. 1982; Young et al. 1982).

L'ablació de la proteïna UCP1 bloca la termogènesi induïda per la dieta i indueix obesitat (Feldmann et al. 2009).

El fet que la funció del TAM estigui sotmesa al control de diversos estímuls fisiològics fa que aquest teixit presenti un contingut mitocondrial molt plàstic. Per això, el TAM representa un model molt útil per estudiar la funció i biogènesi mitocondrials en petits mamífers. A més a més, la descripció recent de la presència de TAM actiu en humans adults (Saito et al. 2009; Virtanen et al. 2009; Zingaretti et al. 2009) fa que els estudis duts a terme en aquest teixit de cada vegada siguin més interessants, ja que, com ha estat suggerit, podrien ser aplicables als humans en un futur (Nedergaard et al. 2010). De moment, però, la significança fisiològica del TAM en humans encara no està definida.

La termogènesi induïda per la dieta sembla que no és una funció exclusiva del TAM, sinó que hi ha altres teixits, com el fetge, que també hi poden participar d'una manera significativa (Ma et al. 1989). Això explicaria que, sorprenentment, segons alguns models d'estudi, l'absència de la proteïna UCP1 en el TAM no impliqui desenvolupar obesitat (Enerback et al. 1997; Liu et al. 2003) i suggereix que hi ha altres mecanismes de termogènesi induïda per la dieta independents de la proteïna UCP1 (Bachman et al. 2002).

La funció termogènica del fetge pot ser atribuïda a la presència d'una proteïna homòloga a la UCP1, la UCP2, l'expressió de la qual incrementa considerablement en resposta a l'obesitat dietètica o genètica (Chavin et al. 1999; Memon et al. 2000). La funció fisiològica de la UCP2, així com d'altres proteïnes homòlogues (UCP3, UCP4 i UCP5) que es troben en teixits com el múscul, el teixit adipós, el pàncrees o el cervell, no està completament establerta (Echtay 2007). No obstant això, sembla que la proteïna UCP2 actua de dissipadora del gradient protònic generat durant la respiració mitocondrial, possiblement com a resposta encaminada a reduir la formació de ROS mitocondrial (Kuhla et al. 2010), la qual cosa és considerada un mecanisme preventiu de les patologies associades a l'estrès oxidatiu hepàtic, com és el cas de la malaltia del fetge gras.

La deposició de lípids en el fetge és el tret essencial de la manifestació hepàtica de la síndrome metabòlica, que és coneguda com la malaltia del fetge gras no associada a la ingesta d'alcohol. A conseqüència de l'augment de la prevalença de l'obesitat, aquesta

malaltia s'ha convertit en la causa més habitual de trastorns hepàtics en la societat occidental i té una incidència més elevada en els homes que en les dones (Denzer et al. 2009). Els mecanismes implicats en l'acumulació de lípids en el fetge són diversos. L'obesitat dietètica provoca més flux d'àcids grassos cap al fetge a conseqüència de l'augment de la lipòlisi, principalment en el teixit adipós visceral. Addicionalment, la lipogènesi i les dietes riques en greixos contribueixen a l'acumulació hepàtica de lípids, circumstància que pot ser compensada, en part, per la formació de colesterol VLDL, per l'increment de l'oxidació dels àcids grassos o pel descens de l'activació de la proteïna AKT que bloca la síntesi *de novo* (Ono et al. 2003; Marra et al. 2008).

Encara queden moltes qüestions per resoldre pel que fa a les causes i conseqüències exactes de la malaltia del fetge gras, entre les quals hi ha les del dimorfisme sexual en la susceptibilitat de la malaltia o les del paper del funcionament mitocondrial. Per tot això, el fetge és un teixit especialment interessant per estudiar les diferències de sexe en les alteracions de la biogènesi mitocondrial associades a l'obesitat. A més a més, tenint en compte que el fetge té un paper clau en l'homeòstasi de la glucosa, és d'esperar que les alteracions associades a la dieta impliquin canvis en la sensibilitat a la insulina i en la funció hepàtica.

2. OBJECTIUS I PLANTEJAMENT EXPERIMENTAL

2. OBJECTIUS I PLANTEJAMENT EXPERIMENTAL

El treball que hem desenvolupat en aquesta tesi doctoral forma part d'una línia d'investigació més àmplia que pretén aprofundir en el coneixement dels mecanismes moleculars responsables del dimorfisme sexual existent en la funció i biogènesi mitocondrials, així com analitzar el paper que hi té l'estrès oxidatiu. Concretament, l'objectiu general d'aquesta tesi ha estat investigar la influència del sexe en els efectes que té l'obesitat sobre la funció i biogènesi mitocondrials del TAM i del fetge, i establir la relació que podria tenir amb la sensibilitat tissular a la insulina.

El TAM i el fetge són dos teixits que tenen funcions clarament diferenciades en el metabolisme energètic. El TAM té una funció molt especialitzada com a efector de la termogènesi adaptativa i és molt important en el control del pes corporal. El seu contingut mitocondrial es modifica en resposta als canvis ambientals i fisiològics, com el fred o la ingesta (Mercer et al. 1987; Rehnmark et al. 1992; Lowell et al. 2000), per la qual cosa és un teixit molt útil per estudiar la funció i biogènesi mitocondrials en mamífers petits. El fetge, per part seva, és l'òrgan central del metabolisme intermediari i energètic, i té una funció clau en la homeòstasi de la glucosa. És per això que cal esperar que la funció hepàtica sigui condicionada pels canvis en l'activitat mitocondrial associats a l'estat obès.

Els objectius específics d'aquesta tesi doctoral han estat els següents:

1. Establir les diferències de sexe en els efectes que té l'estrès oxidatiu associat a l'obesitat dietètica sobre la biogènesi mitocondrial i l'estat redox del TAM i la connexió que té amb la via de senyalització de la insulina.
2. Investigar si hi ha diferències segons el sexe en els efectes de l'obesitat dietètica sobre la sensibilitat hepàtica a la insulina en relació amb l'acumulació ectòpica de greixos i la funcionalitat mitocondrial del fetge.
3. Aprofundir en el coneixement de la influència que tenen les hormones ovàriques sobre la funció i biogènesi mitocondrials del TAM.

Per assolir els dos primers objectius de la tesi, els quals fan referència a l'estudi dels efectes de l'obesitat dietètica, emprarem rates Wistar d'ambdós sexes que tenien trenta-setmanes d'edat, que s'havien alimentat *ad libitum* amb una dieta estàndard de baix contingut de greix (2,9%) o amb una dieta hiperlipídica (24% de greix) durant vint-i-sis setmanes. La dieta hiperlipídica que vàrem subministrar als animals és l'anomenada «dieta de cafeteria», que està constituïda per aliments típics de consum humà (galletes dolces, paté de fetge de porc, xulla, xocolata, ensaïmada) i pinso estàndard. Aquesta dieta és altament palatable i indueix en els animals una hiperfàgia voluntària i un sobrepès considerable; per això, és un model experimental molt útil per estudiar l'obesitat que desenvolupen els humans per excés d'ingesta (Prada et al. 2005; Milagro et al. 2006).

El nostre grup de recerca havia fet estudis previs que posaven de manifest que hi ha un clar dimorfisme sexual en la morfologia i en la funció mitocondrials del TAM. Les rates femella presentaven mitocondris més diferenciats, amb més capacitat oxidativa i termogènica que els dels mascles (Rodríguez-Cuenca et al. 2002; Justo et al. 2005; Valle et al. 2007). Això a banda, l'estrès oxidatiu en el teixit adipós blanc havia estat associat al desenvolupament d'obesitat i de les patologies associades (Furukawa et al. 2004; Rebolledo et al. 2008). En canvi, la implicació de l'estat redox del TAM en l'obesitat pràcticament no havia estat estudiada. Així doncs, ens plantejarem comprovar si l'obesitat dietètica també provocava canvis en l'estat redox i en la funció mitocondrial del TAM, i si aquests efectes eren diferents en cada sexe. A més a més, també era interessant prendre en consideració la influència de l'entorn hormonal en la regulació de la funció mitocondrial del TAM (Kemnitz et al. 1983; Rodríguez-Cuenca et al. 2002; Silvestri et al. 2005). De fet, la insulina és un dels factors que estan implicats directament en la biogènesi mitocondrial del TAM, ja que indueix l'expressió d'UCP1, una proteïna indicadora de diferenciació en els adipòcits marrons (Valverde et al. 2003; Muraoka et al. 2009). Precisament, per a teixits com el múscul esquelètic, hom ha suggerit que hi podria haver una connexió entre la disfunció mitocondrial associada a l'obesitat i la pèrdua de sensibilitat tissular a la insulina (Lowell et al. 2005). Tenint en compte aquests antecedents, el **primer objectiu** que ens vàrem plantejar va ser estudiar, a nivell del TAM, la influència que tenen els canvis en l'estat redox induïts per l'obesitat dietètica sobre el procés de biogènesi mitocondrial en rates d'ambdós sexes, i la connexió que té amb la via de senyalització de la insulina. Per assolir aquest objectiu,

vàrem determinar les capacitats oxidativa i termogènica, la producció de radicals lliures, els nivells dels enzims antioxidants i dels marcadors de dany oxidatiu, així com l'expressió de les principals proteïnes de la via de senyalització intracel·lular de la insulina i del procés de biogènesi mitocondrial. A més a més, vàrem mesurar els nivells sèrics dels marcadors de sensibilitat a la insulina. Hem recollit els resultats obtinguts d'aquest estudi i la significança que tenen en els **Manuscrits I i II**.

Tradicionalment, la resistència a la insulina havia estat relacionada amb l'obesitat per si mateixa. Això no obstant, més recentment hom ha suggerit que el factor desencadenant de la resistència insulínica és l'acumulació ectòpica de lípids, la qual cosa es produeix quan la capacitat d'expansió del teixit adipós està saturada perquè hi ha una disponibilitat excessiva de nutrients (Virtue et al. 2010). Això a banda, l'alteració del funcionament mitocondrial associada a l'obesitat podria ser un nexa entre l'acumulació ectòpica de lípids i la pèrdua de sensibilitat a la insulina. Concretament, els intermediaris lipídics parcialment oxidats i les ROS —que s'acumulen dins les cèl·lules a conseqüència de la disfunció mitocondrial—, activen cinases que bloquen la via de transducció de la insulina a nivell de l'IRS (Hirosumi et al. 2002). Tenint en compte, per una banda, el paper clau que té el fetge en el metabolisme energètic i en l'homeòstasi de la glucosa i, per l'altra, el dimorfisme sexual existent en la funció i biogènesi mitocondrials del fetge, ens vàrem plantejar, com a **segon objectiu** d'aquesta tesi, estudiar els efectes de l'obesitat dietètica sobre la sensibilitat hepàtica a la insulina en rates d'ambdós sexes i la relació que existeix amb el funcionament mitocondrial i l'acumulació de lípids en el fetge. Per assolir aquest segon objectiu, vàrem mesurar els nivells hepàtics de les principals proteïnes implicades en la via de senyalització de la insulina, així com el contingut de lípids en el fetge i l'índex d'adipositat corporal. També vàrem determinar els nivells dels principals marcadors del procés de biogènesi mitocondrial en el fetge, així com la capacitat oxidativa mitocondrial i l'estat redox del teixit. Discutim els resultats obtinguts d'aquest estudi i les conclusions més rellevants en els **Manuscrits III i IV**.

De cada vegada hi ha més estudis que assenyalen que les hormones sexuals són un dels factors determinants del dimorfisme sexual observat en la incidència de malalties cròniques associades a l'estrès oxidatiu. La reducció de la funció ovàrica durant la menopausa ha estat relacionada amb alteracions dels marcadors d'estrès oxidatiu en

teixits diversos i també amb l'augment del pes corporal i de canvis en el balanç energètic (Gaspard 2009; Teede et al. 2010). Les femelles ovariectomitzades són una bona eina per estudiar les patologies associades a l'augment de l'adipositat que experimenten els humans durant la menopausa. De fet, el pes corporal de les rates femella augmenta aproximadament un 20% en resposta a l'ovariectomia (Roy et al. 1977; Yoshioka et al. 1988) i s'hi instaura una situació d'obesitat no dietètica que podria ser atribuïda a canvis en la capacitat oxidativa del TAM, entre altres alteracions metabòliques. Així doncs, el **tercer objectiu** d'estudi de d'aquesta tesi ha estat determinar el paper que tenen les hormones ovàriques en les diferències de sexe observades prèviament en la funció i la biogènesi mitocondrials del TAM.

Per assolir aquest darrer objectiu, vàrem plantejar un segon disseny experimental, en el qual emprarem rates Wistar d'ambdós sexes i femelles que havien estat ovariectomitzades a les cinc setmanes de vida amb la finalitat d'eliminar-ne la producció endògena d'esteroids ovàrics. Un grup de femelles ovariectomitzades varen ser tractades amb 17- β estradiol les quatre setmanes anteriors al sacrifici, amb una dosi de 10 μ g/kg de pes corporal cada quaranta-vuit hores. Aquest model experimental ens va permetre analitzar les conseqüències que té a llarg termini extirpar els ovaris sobre la funció i biogènesi mitocondrials en l'organisme *in vivo* i comprovar l'efecte de l'administració d'una dosi fisiològica de 17- β estradiol; d'aquesta manera, les limitacions que suposen els estudis *in vitro* són evitades. Vàrem mesurar el pes corporal i l'índex d'adipositat de tots els grups experimentals i, en el TAM, estudiàrem les activitats oxidativa i termogènica, l'estat redox i els nivells de les principals proteïnes que participen en el control de la biogènesi mitocondrial. Discutim els resultats obtinguts i les conclusions més rellevants en el **Manuscrit V**.

A continuació presentam una llista de les determinacions que hem realitzat per assolir els objectius proposats:

- Biometria dels animals i dels teixits estudiats
- Consum d'oxigen i producció de diòxid de carboni corporal per calorimetria indirecta
- Nivells circulants de glucosa, triacilglicèrids, hormones (estrògens, tiroïdes i insulina) i adipoquines (resistina i adiponectina)
- Aïllament dels mitocondris del TAM i del fetge per centrifugació diferencial

- Morfologia mitocondrial mitjançant l'anàlisi d'imatges obtingudes per microscòpia electrònica de transmissió
- Composició tissular del TAM i del fetge (proteïna total i mitocondrial, ADN total i mitocondrial, i contingut de lípids)
- Activitats dels enzims oxidatius (COX i CS) i dels antioxidants (GPx i SOD), així com els nivells de glutatió total i oxidat
- Consum d'oxigen mitocondrial del TAM en presència de glicerol 3 fosfat o palmitoilcarnitina malat durant l'estat 4 de la respiració. Consum d'oxigen mitocondrial del fetge en presència de succinat durant l'estat 4 i 3 de la respiració
- Producció d'H₂O₂ de la cadena respiratòria mitocondrial en presència de glicerol 3 fosfat o palmitoil carnitina-malat com a substrats, en el cas del TAM, i succinat, en el cas del fetge, i d'antimicina A.
- Nivells de substàncies reactives a l'àcid tiobarbitúric (TBARS) i de grups carbonils de proteïnes com a marcadors de dany oxidatiu en els lípids i les proteïnes, respectivament
- Contingut de proteïnes marcadores de la biogènesi mitocondrial (TFAM, COX II i COX IV), de la termogènesi adaptativa (UCP1) i de la via de senyalització de la insulina (IR β , IRS2, AKT, PI3K i JNK), així com l'activació per fosforilació de les proteïnes IRS2, AKT, PI3K i JNK per transferència de Western (*western blot*)
- Nivells d'ARNm dels gens PGC-1 α , NRF1, NRF2, i del gen GADPH com a control, per PCR a temps real

El treball que presentam en aquesta tesi l'hem dut a terme amb el Grup de Metabolisme Energètic i Nutrició del Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut de la Universitat de les Illes Balears. Mentre ha desenvolupat aquesta tesi, la doctoranda ha disposat d'una beca predoctoral concedida pel Govern de les Illes Balears. Igualment, aquest treball ha estat possible gràcies als projectes d'investigació PI060293 i PI060266, finançats pel Fondo de Investigaciones Sanitarias del Instituto de Salud Carlos III, i al PROGECIB-1C, finançat per la Conselleria d'Innovació i Energia del Govern de les Illes Balears.

3. RESULTATS I DISCUSSIÓ

Manuscrit I

Brown adipose tissue redox status in response to dietary-induced obesity-associated oxidative stress in male and female rats

Nadal-Casellas A, Proenza AM, Gianotti M, Lladó I.

Stress 14 (2):174-84, 2011

Manuscrit II

Sex-dependent differences in rat brown adipose tissue mitochondrial biogenesis and insulin signaling parameters in response to an obesogenic diet

Nadal-Casellas A, Bauzá-Thorbrügge M, Proenza AM, Gianotti M, Lladó I.

Mol Cell Biochem 373(1-2):125-35, 2013

Manuscrit III

Sex-dependent differences in rat hepatic lipid accumulation and insulin sensitivity in response to diet-induced obesity

Nadal-Casellas A, Proenza AM, Lladó I, Gianotti M.

Biochem Cell Biol 90(2):164-72, 2012

Manuscrit IV

Long-term high-fat-diet feeding impairs mitochondrial biogenesis in liver of male and female rats

Nadal-Casellas, A., E. Amengual-Cladera, A. M. Proenza, I. Lladó, M. Gianotti

Cell Physiol Biochem 26 (3): 291-302, 2010

Manuscrit V

Effects of ovariectomy and 17- β estradiol replacement on rat brown adipose tissue mitochondrial function

Nadal-Casellas A, Proenza AM, Lladó I, Gianotti M.

Steroids 76(10-11):1051-6, 2011

4. RECAPITULACIÓ

4. RECAPITULACIÓ

L'eix central d'aquesta tesi doctoral ha estat estudiar quina influència té el sexe en els efectes de l'obesitat sobre la funció i biogènesi mitocondrials del TAM i del fetge en relació amb els canvis que l'estat obès indueix en la sensibilitat a la insulina.

En els animals control, hom havia descrit que les diferències de sexe, pel que fa al funcionament mitocondrial del TAM i del fetge, apuntaven que les rates femella tenen mitocondris més diferenciats i funcionals que les mascle (Rodríguez-Cuenca et al. 2002; Justo et al. 2005a; Justo et al. 2005b). Els resultats obtinguts en aquesta tesi ens han permès comprovar que aquest dimorfisme sexual s'atenua per efecte de l'obesitat dietètica en el TAM, però que es manté en el fetge. Concretament, el TAM de les rates mascle respon a l'obesitat amb un augment de les capacitats oxidatives i termogèniques, mentre que el de les femelles hi respon amb una reducció de la capacitat oxidativa, acompanyada d'un desequilibri de les defenses antioxidants, per la qual cosa hi augmenta el dany oxidatiu. En canvi, en el fetge, s'activa la proliferació mitocondrial en ambdós sexes com a mecanisme compensatori per fer front a l'excés de nutrients; d'aquesta manera, s'evita l'augment del dany oxidatiu hepàtic associat a la dieta. Cal destacar que, encara que les rates femella resulten més afectades per l'obesitat que les mascle, també mantenen sempre la capacitat oxidativa més elevada.

Estudis previs han proposat que hi ha una connexió entre la via de senyalització de la insulina i el procés de biogènesi mitocondrial (Lowell et al. 2005). D'aquesta manera, la inhibició de la via PI3K/AKT per part de les ROS i d'intermediaris lipídics parcialment oxidats durant l'obesitat (Hirosumi et al. 2002) es podria traduir en una alteració del procés de biogènesi mitocondrial. De fet, en aquesta tesi hem comprovat que la resistència a la insulina —detectada tant en el nivell circulant com en el TAM— solament augmenta en les femelles obeses i coincideix amb una reducció de la diferenciació mitocondrial, la qual cosa donaria suport a la hipòtesi que relaciona la via de senyalització de la insulina i el procés de biogènesi mitocondrial. A més a més, en el TAM de les rates femella obeses, l'acumulació de més dany oxidatiu hi provocaria disfunció mitocondrial, però ho intentaria compensar amb l'estimulació de la proliferació. En canvi, podem considerar que l'augment de la diferenciació mitocondrial que hi ha en el TAM dels mascles obesos és un mecanisme de protecció que evitaria que

incrementàs el dany oxidatiu i que sorgís una situació de resistència tissular a la insulina encara més severa.

Les diferències de sexe en el funcionament mitocondrial del TAM durant l'obesitat poden estar relacionades amb el marcat dimorfisme sexual que hem observat en el guany de pes corporal. Així doncs, l'augment de la diferenciació mitocondrial que indueix l'alimentació amb una dieta hiperlipídica en el TAM de les rates mascle s'acompanya d'una estimulació de la termogènesi induïda per la dieta, la qual cosa explicaria la resistència dels mascles a incrementar el pes corporal (aproximadament, un 20%) en comparació amb les femelles (més d'un 50%). Per contra, la pèrdua de funcionalitat mitocondrial que provoca el tractament dietètic en el TAM de les rates femella podem interpretar-la com un mecanisme que els permet adaptar-se a una situació d'abundància d'aliments i incrementar el pes corporal per poder fer front amb més possibilitats d'èxit a situacions característiques del període reproductiu, com són l'embaràs i l'alletament. De fet, al llarg de l'evolució, les femelles han estat sotmeses a més pressió selectiva que els mascles, la qual cosa els ha obligat a desenvolupar tot un ventall d'adaptacions per assegurar no solament la supervivència pròpia, sinó també la dels descendents (Hoyenga et al. 1982).

A conseqüència de la ingesta de la dieta hiperlipídica, l'augment de pes més elevat en les rates femella és acompanyat d'un increment també més elevat de la massa dels teixits adiposos. Aquesta adipositat podria estar relacionada amb una capacitat més gran d'expansió dels dipòsits de greix i podria formar part de l'estratègia adaptativa de les femelles. D'aquesta manera, les femelles augmentarien el reservori corporal d'energia, però limitarien els efectes nocius derivats de la lipotoxicitat, ja que dipositen els lípids en teixits no destinats a aquesta funció quan la capacitat d'expansió del teixit adipós està saturada (Frayn 2002; van Herpen et al. 2008). De fet, malgrat que les rates femella tenen més excés de pes corporal, acumulen molts menys lípids en el fetge que els mascles. Aquestes diferències entre sexe podrien estar relacionades amb el dimorfisme sexual que hem observat en la sensibilitat hepàtica a la insulina. Com passa en el TAM, la resistència hepàtica a la insulina solament augmenta en les rates femella com a resultat de l'alimentació amb la dieta hiperlipídica. No obstant això, les rates femella obeses no arriben a assolir el grau de resistència a la insulina que presenten els mascles. Si tenim en compte la connexió existent entre la via de senyalització de la insulina i el

control de la lipogènesi (Leavens et al. 2009), podem interpretar la resistència hepàtica a la insulina que tenen les femelles obesas com un mecanisme de protecció encaminat a endarrerir el desenvolupament del fetge gras. A més a més, podem atribuir les diferències de sexe pel que fa a l'acumulació ectòpica de lípids en el fetge al dimorfisme sexual en la funció mitocondrial d'aquest teixit. Encara que hem comprovat que l'obesitat indueix la proliferació mitocondrial en el fetge d'ambdós sexes, les rates femella mantenen més capacitat oxidativa hepàtica que les mascle. Això implica que les femelles poden oxidar l'excés de substrats disponibles d'una manera més eficient minvant l'emmagatzematge de lípids en el fetge.

Les diferències de sexe descrites en la funció mitocondrial del TAM són causades, en part, per l'activació del procés de biogènesi mitocondrial per part de les hormones ovàriques, tal com ens ha permès confirmar l'estudi que hem dut a terme en aquesta tesi amb rates ovariectomitzades. Així doncs, com ha estat descrit per a altres teixits (Chen et al. 2009), en el TAM, els estrògens també activen l'expressió de les proteïnes de la via mitocondriogènica del PGC-1 α . En resposta a l'ovariectomia, la població mitocondrial del TAM està constituïda per més mitocondris, però estan menys diferenciats, la qual cosa s'assembla al perfil que hem observat en els mascles. En qualsevol cas, en les rates ovariectomitzades, els nivells dels marcadors de la capacitat oxidativa del TAM no arriben a ser tan baixos com els dels mascles, i el tractament amb E2 solament aconsegueix atenuar lleugerament els efectes de l'ovariectomia. Així doncs, sembla que les hormones ovàriques no són els únics factors responsables de les diferències de sexe en la funció mitocondrial, i no podem descartar la resposta esteroidogènica d'altres teixits —com el teixit adipós blanc— per compensar la manca d'estrògens associada a l'ovariectomia.

L'ovariectomia indueix l'activació de la capacitat termogènica del TAM, cosa que en principi podríem interpretar com un mecanisme encaminat a evitar guanyar pes corporal. No obstant això, com també ocorre en el model d'obesitat dietètica que hem estudiat en aquesta tesi, l'augment de la proteïna UCP1 no és suficient per evitar l'obesitat. A més a més, el tractament amb E2 provoca un descens del pes corporal, però no altera la capacitat termogènica del TAM. Els nostres resultats suggereixen que, en resposta a l'ovariectomia, el TAM tendria un paper secundari en el control del pes corporal. És possible que altres teixits, com el múscul esquelètic, que tenen més alterada

la capacitat oxidativa per efecte dels estrògens (Campbell et al. 2001), hi siguin més determinants.

En conjunt, els resultats obtinguts en el desenvolupament d'aquesta tesi doctoral estableixen que els efectes que té l'obesitat sobre el funcionament mitocondrial i la sensibilitat a la insulina depenen del sexe. A diferència dels mascles, l'alimentació amb la dieta hiperlipídica induïx les rates femella a guanyar més pes corporal, a acumular més greix en el teixit adipós blanc i a augmentar la resistència a la insulina, tant la circulant com en el TAM i en el fetge. Per una banda, la pèrdua de la sensibilitat a la insulina del TAM de les femelles pot estar relacionada amb el descens de la capacitat oxidativa mitocondrial del teixit i amb l'augment del dany oxidatiu. Per altra banda, podem considerar que el fet que el fetge de les rates femella sigui més resistent a la insulina que el dels mascles i que també mantengui una capacitat oxidativa mitocondrial més elevada són mecanismes de protecció enfront de la lipotoxicitat hepàtica induïda per la dieta. Cal destacar que, en una situació control, les rates femella són més sensibles a la insulina i tenen més capacitat oxidativa mitocondrial que les mascles. Per això, malgrat que les alteracions induïdes per la dieta siguin més paleses en les femelles que en els mascles, aquestes aconseguen mantenir un estat més saludable. En aquest sentit, les diferències de sexe observades en els efectes del tractament dietètic i l'obesitat podrien estar relacionades amb el dimorfisme sexual descrit en la incidència de patologies associades a l'obesitat i a l'estrès oxidatiu. El paper dels estrògens en aquest context és un factor que hem de tenir en compte, ja que, entre altres funcions, actuen com a defenses antioxidants i activen la capacitat oxidativa mitocondrial. Això explicaria que les patologies associades a la síndrome metabòlica apareguin més tard en les dones que en els homes, coincidint amb l'arribada de la menopausa.

5. CONCLUSIONS

5. CONCLUSIONS

I. L'alimentació amb la dieta de cafeteria durant vint-i-sis setmanes indueix un augment de la ingesta energètica, la qual provoca un sobrepès d'un 50% en les rates femella i d'un 20% en les mascle. Aquest sobrepès va acompanyat d'un increment més gran de l'adipositat en les femelles que en els mascles.

II. La sensibilitat a la insulina és més elevada en les rates control femella que en les mascle. En resposta al tractament dietètic, però, els marcadors circulants de resistència a la insulina augmenten solament en les rates femella, de manera que les diferències entre ambdós sexes s'atenuen.

III. Les rates control femella presenten en el teixit adipós marró mitocondris més diferenciats i funcionals. No obstant això, aquestes diferències de sexe minven per l'efecte de l'obesitat dietètica, ja que els mascles experimenten un augment de la diferenciació mitocondrial, la qual cosa dona lloc a un increment de les capacitats oxidativa i termogènica; aquest comportament podria estar relacionat amb la resistència que tenen els mascles a augmentar el pes corporal. En canvi, en el teixit adipós marró de les rates femella, el tractament dietètic produeix disfunció mitocondrial i desequilibri en les defenses antioxidants que s'intenta compensar amb un increment de la proliferació mitocondrial.

IV. En el teixit adipós marró de les rates femella obeses, la resistència a la insulina es produeix paral·lelament a la pèrdua de funcionalitat mitocondrial i a l'augment del dany oxidatiu, la qual cosa reforçaria la hipòtesi que hi ha una connexió entre la via de senyalització de la insulina i el procés de biogènesi mitocondrial. En el teixit adipós marró de les rates mascle, l'increment de la diferenciació mitocondrial induït per la dieta evitaria que augmenti el dany oxidatiu tissular i una situació de resistència a la insulina encara més severa.

V. D'una manera semblant al que passa en el teixit adipós marró, el fetge de les rates control femella té mitocondris més diferenciats i funcionals i un nivell de defenses antioxidants més elevat que el dels mascles. En ambdós sexes, l'obesitat dietètica

indueix la proliferació mitocondrial, cosa que podem interpretar com un mecanisme compensatori per fer front a l'excés de nutrients i evitar que augmenti del dany oxidatiu hepàtic. El resultat és una població mitocondrial constituïda per mitocondris menys diferenciats; no obstant això, el fetge de les femelles obesas continua mantenint més capacitat oxidativa que el dels mascles.

VI. La deposició ectòpica de lípids en el fetge és menor en les rates femella obesas que en les mascles i això ho podem relacionar amb una capacitat més elevada d'acumular greix en el teixit adipós blanc. La pèrdua de sensibilitat a la insulina induïda per la dieta i la capacitat oxidativa mitocondrial més elevada del fetge poden ser les responsables d'aquesta acumulació ectòpica de greix menor en les femelles, la qual cosa evitaria els efectes perjudicials de la lipotoxicitat associats a l'obesitat.

VII. Les hormones ovàriques són responsables, en part, de les diferències de sexe en la funció mitocondrial del teixit adipós marró. L'extirpació dels ovaris induïx la proliferació mitocondrial i el resultat és una població mitocondrial constituïda per mitocondris menys diferenciats. Aquesta situació és semblant a la que observam en els mascles control. No obstant això, l'ovariectomia no atenua completament les diferències de sexe en el funcionament mitocondrial del teixit adipós marró i el tractament amb una dosi fisiològica de 17- β estradiol no aconsegueix revertir completament els efectes de l'ovariectomia.

6. REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

6. REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

Afanas'ev, I. B. (2007). "Signaling functions of free radicals superoxide & nitric oxide under physiological & pathological conditions." Mol Biotechnol **37**(1): 2-4.

Alessi, D. R., M. Andjelkovic, B. Caudwell, P. Cron, N. Morrice, P. Cohen and B. A. Hemmings (1996). "Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1." Embo J **15**(23): 6541-51.

Attardi, G. and G. Schatz (1988). "Biogenesis of mitochondria." Annu Rev Cell Biol **4**: 289-333.

Bachman, E. S., H. Dhillon, C. Y. Zhang, S. Cinti, A. C. Bianco, B. K. Kobilka and B. B. Lowell (2002). "betaAR signaling required for diet-induced thermogenesis and obesity resistance." Science **297**(5582): 843-5.

Bellacosa, A., T. O. Chan, N. N. Ahmed, K. Datta, S. Malstrom, D. Stokoe, F. McCormick, J. Feng and P. Tsichlis (1998). "Akt activation by growth factors is a multiple-step process: the role of the PH domain." Oncogene **17**(3): 313-25.

Beyer, T. A., W. Xu, D. Teupser, U. auf dem Keller, P. Bugnon, E. Hildt, J. Thiery, Y. W. Kan and S. Werner (2008). "Impaired liver regeneration in Nrf2 knockout mice: role of ROS-mediated insulin/IGF-1 resistance." Embo J **27**(1): 212-23.

Bi, R., G. Broutman, M. R. Foy, R. F. Thompson and M. Baudry (2000). "The tyrosine kinase and mitogen-activated protein kinase pathways mediate multiple effects of estrogen in hippocampus." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(7): 3602-7.

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): 719-27.

Borras, C., J. Gambini, M. C. Gomez-Cabrera, J. Sastre, F. V. Pallardo, G. E. Mann and J. Viña (2005). "17beta-oestradiol up-regulates longevity-related, antioxidant enzyme expression via the ERK1 and ERK2[MAPK]/NFkappaB cascade." Aging Cell **4**(3): 113-8.

Brooks, S. L., N. J. Rothwell, M. J. Stock, A. E. Goodbody and P. Trayhurn (1980). "Increased proton conductance pathway in brown adipose tissue mitochondria of rats exhibiting diet-induced thermogenesis." Nature **286**(5770): 274-6.

Brown, M. S. and J. L. Goldstein (2008). "Selective versus total insulin resistance: a pathogenic paradox." Cell Metab **7**(2): 95-6.

Bruce, K. D. and M. A. Hanson (2010). "The developmental origins, mechanisms, and implications of metabolic syndrome." J Nutr **140**(3): 648-52.

Calera, M. R., C. Martinez, H. Liu, A. K. Jack, M. J. Birnbaum and P. F. Pilch (1998). "Insulin increases the association of Akt-2 with Glut4-containing vesicles." J Biol Chem **273**(13): 7201-4.

- Campbell, S. E. and M. A. Febbraio (2001). "Effect of ovarian hormones on mitochondrial enzyme activity in the fat oxidation pathway of skeletal muscle." Am J Physiol Endocrinol Metab **281**(4): E803-8.
- Cannon, B. and J. Nedergaard (2004). "Brown adipose tissue: function and physiological significance." Physiol Rev **84**(1): 277-359.
- Cantrell, D. A. (2001). "Phosphoinositide 3-kinase signalling pathways." J Cell Sci **114**(Pt 8): 1439-45.
- Cinti, S. (2005). "The adipose organ." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **73**(1): 9-15.
- Clayton, D. A. (2003). "Mitochondrial DNA replication: what we know." IUBMB Life **55**(4-5): 213-7.
- 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): 205-12.
- Colom, B., J. Oliver, P. Roca and F. J. Garcia-Palmer (2007b). "Caloric restriction and gender modulate cardiac muscle mitochondrial H₂O₂ production and oxidative damage." Cardiovasc Res **74**(3): 456-65.
- Cross, D. A., D. R. Alessi, P. Cohen, M. Andjelkovich and B. A. Hemmings (1995). "Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B." Nature **378**(6559): 785-9.
- Chance, B., H. Sies and A. Boveris (1979). "Hydroperoxide metabolism in mammalian organs." Physiol Rev **59**(3): 527-605.
- Chang, D. D. and D. A. Clayton (1987). "A novel endoribonuclease cleaves at a priming site of mouse mitochondrial DNA replication." Embo J **6**(2): 409-17.
- Chau, K. Y., H. Y. Lam and K. L. Lee (1998). "Estrogen treatment induces elevated expression of HMG1 in MCF-7 cells." Exp Cell Res **241**(1): 269-72.
- Chavin, K. D., S. Yang, H. Z. Lin, J. Chatham, V. P. Chacko, J. B. Hoek, E. Walajtys-Rode, A. Rashid, C. H. Chen, C. C. Huang, T. C. Wu, M. D. Lane and A. M. Diehl (1999). "Obesity induces expression of uncoupling protein-2 in hepatocytes and promotes liver ATP depletion." J Biol Chem **274**(9): 5692-700.
- Chen, J., D. A. Schwartz, T. A. Young, J. S. Norris and J. D. Yager (1996). "Identification of genes whose expression is altered during mitosuppression in livers of ethinyl estradiol-treated female rats." Carcinogenesis **17**(12): 2783-6.
- Chen, J. Q., P. R. Cammarata, C. P. Baines and J. D. Yager (2009). "Regulation of mitochondrial respiratory chain biogenesis by estrogens/estrogen receptors and physiological, pathological and pharmacological implications." Biochim Biophys Acta **1793**(10): 1540-70.

Chen, J. Q., M. Eshete, W. L. Alworth and J. D. Yager (2004). "Binding of MCF-7 cell mitochondrial proteins and recombinant human estrogen receptors alpha and beta to human mitochondrial DNA estrogen response elements." J Cell Biochem **93**(2): 358-73.

Chen, S., P. L. Nagy and H. Zalkin (1997). "Role of NRF-1 in bidirectional transcription of the human GPAT-AIRC purine biosynthesis locus." Nucleic Acids Res **25**(9): 1809-16.

Cho, H., J. Mu, J. K. Kim, J. L. Thorvaldsen, Q. Chu, E. B. Crenshaw, 3rd, K. H. Kaestner, M. S. Bartolomei, G. I. Shulman and M. J. Birnbaum (2001a). "Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta)." Science **292**(5522): 1728-31.

Cho, H., J. L. Thorvaldsen, Q. Chu, F. Feng and M. J. Birnbaum (2001b). "Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice." J Biol Chem **276**(42): 38349-52.

Choi, Y. S., H. K. Lee and Y. K. Pak (2002). "Characterization of the 5'-flanking region of the rat gene for mitochondrial transcription factor A (Tfam)." Biochim Biophys Acta **1574**(2): 200-4.

Dairaghi, D. J., G. S. Shadel and D. A. Clayton (1995a). "Addition of a 29 residue carboxyl-terminal tail converts a simple HMG box-containing protein into a transcriptional activator." J Mol Biol **249**(1): 11-28.

Dairaghi, D. J., G. S. Shadel and D. A. Clayton (1995b). "Human mitochondrial transcription factor A and promoter spacing integrity are required for transcription initiation." Biochim Biophys Acta **1271**(1): 127-34.

Das, K. C., Y. Lewis-Molock and C. W. White (1995). "Activation of NF-kappa B and elevation of MnSOD gene expression by thiol reducing agents in lung adenocarcinoma (A549) cells." Am J Physiol **269**(5 Pt 1): L588-602.

Davies, K. J. (1995). "Oxidative stress: the paradox of aerobic life." Biochem Soc Symp **61**: 1-31.

Demonacos, C. V., N. Karayanni, E. Hatzoglou, C. Tsiriyiotis, D. A. Spandidos and C. E. Sekeris (1996). "Mitochondrial genes as sites of primary action of steroid hormones." Steroids **61**(4): 226-32.

Denzer, C., D. Thiere, R. Muche, W. Koenig, H. Mayer, W. Kratzer and M. Wabitsch (2009). "Gender-specific prevalences of fatty liver in obese children and adolescents: roles of body fat distribution, sex steroids, and insulin resistance." J Clin Endocrinol Metab **94**(10): 3872-81.

Dominy, J. E., Jr., Y. Lee, Z. Gerhart-Hines and P. Puigserver (2010). "Nutrient-dependent regulation of PGC-1alpha's acetylation state and metabolic function through the enzymatic activities of Sirt1/GCN5." Biochim Biophys Acta **1804**(8): 1676-83.

Droge, W. (2002). "Free radicals in the physiological control of cell function." Physiol Rev **82**(1): 47-95.

- Echtay, K. S. (2007). "Mitochondrial uncoupling proteins--what is their physiological role?" Free Radic Biol Med **43**(10): 1351-71.
- Enerback, S., A. Jacobsson, E. M. Simpson, C. Guerra, H. Yamashita, M. E. Harper and L. P. Kozak (1997). "Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese." Nature **387**(6628): 90-4.
- Enriori, P. J., A. E. Evans, P. Sinnayah and M. A. Cowley (2006). "Leptin resistance and obesity." Obesity (Silver Spring) **14 Suppl 5**: 254S-258S.
- Falkenberg, M., M. Gaspari, A. Rantanen, A. Trifunovic, N. G. Larsson and C. M. Gustafsson (2002). "Mitochondrial transcription factors B1 and B2 activate transcription of human mtDNA." Nat Genet **31**(3): 289-94.
- Feldmann, H. M., V. Golozoubova, B. Cannon and J. Nedergaard (2009). "UCP1 ablation induces obesity and abolishes diet-induced thermogenesis in mice exempt from thermal stress by living at thermoneutrality." Cell Metab **9**(2): 203-9.
- Fernandez-Silva, P., J. A. Enriquez and J. Montoya (2003). "Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA." Exp Physiol **88**(1): 41-56.
- Fernandez-Silva, P., F. Martinez-Azorin, V. Micol and G. Attardi (1997). "The human mitochondrial transcription termination factor (mTERF) is a multizipper protein but binds to DNA as a monomer, with evidence pointing to intramolecular leucine zipper interactions." Embo J **16**(5): 1066-79.
- Fisher, R. P., T. Lisowsky, M. A. Parisi and D. A. Clayton (1992). "DNA wrapping and bending by a mitochondrial high mobility group-like transcriptional activator protein." J Biol Chem **267**(5): 3358-67.
- Flamment, M., M. Arvier, Y. Gallois, G. Simard, Y. Malthiery, P. Ritz and P. H. Ducluzeau (2008). "Fatty liver and insulin resistance in obese Zucker rats: no role for mitochondrial dysfunction." Biochimie **90**(9): 1407-13.
- Frasca, F., G. Pandini, P. Scalia, L. Sciacca, R. Mineo, A. Costantino, I. D. Goldfine, A. Belfiore and R. Vigneri (1999). "Insulin receptor isoform A, a newly recognized, high-affinity insulin-like growth factor II receptor in fetal and cancer cells." Mol Cell Biol **19**(5): 3278-88.
- Frayn, K. N. (2002). "Adipose tissue as a buffer for daily lipid flux." Diabetologia **45**(9): 1201-10.
- Fridlyand, L. E. and L. H. Philipson (2006). "Reactive species and early manifestation of insulin resistance in type 2 diabetes." Diabetes Obes Metab **8**(2): 136-45.
- 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): 1752-61.
- 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.

Garofalo, R. S., S. J. Orena, K. Rafidi, A. J. Torchia, J. L. Stock, A. L. Hildebrandt, T. Coskran, S. C. Black, D. J. Brees, J. R. Wicks, J. D. McNeish and K. G. Coleman (2003). "Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB beta." J Clin Invest **112**(2): 197-208.

Gaspard, U. (2009). "Hyperinsulinaemia, a key factor of the metabolic syndrome in postmenopausal women." Maturitas **62**(4): 362-5.

Gleyzer, N., K. Vercauteren and R. C. Scarpulla (2005). "Control of mitochondrial transcription specificity factors (TFB1M and TFB2M) by nuclear respiratory factors (NRF-1 and NRF-2) and PGC-1 family coactivators." Mol Cell Biol **25**(4): 1354-66.

Gnacinska, M., S. Malgorzewicz, M. Stojek, W. Lysiak-Szydlowska and K. Sworczak (2009). "Role of adipokines in complications related to obesity: a review." Adv Med Sci **54**(2): 150-7.

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): 539-48.

Griffin, M. E., M. J. Marcucci, G. W. Cline, K. Bell, N. Barucci, D. Lee, L. J. Goodyear, E. W. Kraegen, M. F. White and G. I. Shulman (1999). "Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C theta and alterations in the insulin signaling cascade." Diabetes **48**(6): 1270-4.

Guerre-Millo, M. (2004). "Adipose tissue and adipokines: for better or worse." Diabetes Metab **30**(1): 13-9.

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.

Gugneja, S. and R. C. Scarpulla (1997). "Serine phosphorylation within a concise amino-terminal domain in nuclear respiratory factor 1 enhances DNA binding." J Biol Chem **272**(30): 18732-9.

Gugneja, S., C. M. Virbasius and R. C. Scarpulla (1996). "Nuclear respiratory factors 1 and 2 utilize similar glutamine-containing clusters of hydrophobic residues to activate transcription." Mol Cell Biol **16**(10): 5708-16.

Hawkins, P. T., T. R. Jackson and L. R. Stephens (1992). "Platelet-derived growth factor stimulates synthesis of PtdIns(3,4,5)P3 by activating a PtdIns(4,5)P2 3-OH kinase." Nature **358**(6382): 157-9.

Hensley, K., K. A. Robinson, S. P. Gabbita, S. Salsman and R. A. Floyd (2000). "Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury." Free Radic Biol Med **28**(10): 1456-62.

Herzig, R. P., S. Scacco and R. C. Scarpulla (2000). "Sequential serum-dependent activation of CREB and NRF-1 leads to enhanced mitochondrial respiration through the induction of cytochrome c." J Biol Chem **275**(17): 13134-41.

Hirosumi, J., G. Tuncman, L. Chang, C. Z. Gorgun, K. T. Uysal, K. Maeda, M. Karin and G. S. Hotamisligil (2002). "A central role for JNK in obesity and insulin resistance." Nature **420**(6913): 333-6.

Hock, M. B. and A. Kralli (2009). "Transcriptional control of mitochondrial biogenesis and function." Annu Rev Physiol **71**: 177-203.

Hoyenga, K. B. and K. T. Hoyenga (1982). "Gender and energy balance: sex differences in adaptations for feast and famine." Physiol Behav **28**(3): 545-63.

Hsieh, Y. C., S. Yang, M. A. Choudhry, H. P. Yu, L. W. Rue, 3rd, K. I. Bland and I. H. Chaudry (2005). "PGC-1 upregulation via estrogen receptors: a common mechanism of salutary effects of estrogen and flutamide on heart function after trauma-hemorrhage." Am J Physiol Heart Circ Physiol **289**(6): H2665-72.

Irwin, R. W., J. Yao, R. T. Hamilton, E. Cadenas, R. D. Brinton and J. Nilsen (2008). "Progesterone and estrogen regulate oxidative metabolism in brain mitochondria." Endocrinology **149**(6): 3167-75.

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): C372-8.

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): 1147-58.

Kadowaki, T., T. Yamauchi, N. Kubota, K. Hara, K. Ueki and K. Tobe (2006). "Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome." J Clin Invest **116**(7): 1784-92.

Kelly, D. P. and R. C. Scarpulla (2004). "Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function." Genes Dev **18**(4): 357-68.

Kemnitz, J. W., Z. Glick and G. A. Bray (1983). "Ovarian hormones influence brown adipose tissue." Pharmacol Biochem Behav **18**(4): 563-6.

Koppenol, W. H. (1998). "The basic chemistry of nitrogen monoxide and peroxynitrite." Free Radic Biol Med **25**(4-5): 385-91.

Korhonen, J. A., M. Gaspari and M. Falkenberg (2003). "TWINKLE Has 5' -> 3' DNA helicase activity and is specifically stimulated by mitochondrial single-stranded DNA-binding protein." J Biol Chem **278**(49): 48627-32.

Kruse, B., N. Narasimhan and G. Attardi (1989). "Termination of transcription in human mitochondria: identification and purification of a DNA binding protein factor that promotes termination." Cell **58**(2): 391-7.

Kuhla, A., C. Hettwer, M. D. Menger and B. Vollmar (2010). "Oxidative stress-associated rise of hepatic protein glycation increases inflammatory liver injury in uncoupling protein-2 deficient mice." Lab Invest **90**(8): 1189-98.

- Kupriyanova, T. A. and K. V. Kandror (1999). "Akt-2 binds to Glut4-containing vesicles and phosphorylates their component proteins in response to insulin." J Biol Chem **274**(3): 1458-64.
- Lafontan, M., P. Barbe, J. Galitzky, G. Tavernier, D. Langin, C. Carpene, A. Bousquet-Melou and M. Berlan (1997). "Adrenergic regulation of adipocyte metabolism." Hum Reprod **12 Suppl 1**: 6-20.
- Lafontan, M. and M. Berlan (1995). "Fat cell alpha 2-adrenoceptors: the regulation of fat cell function and lipolysis." Endocr Rev **16**(6): 716-38.
- Lawlor, M. A. and D. R. Alessi (2001). "PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses?" J Cell Sci **114**(Pt 16): 2903-10.
- Leavens, K. F., R. M. Easton, G. I. Shulman, S. F. Previs and M. J. Birnbaum (2009). "Akt2 is required for hepatic lipid accumulation in models of insulin resistance." Cell Metab **10**(5): 405-18.
- 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): 822-34.
- Leslie, N. R., D. Bennett, Y. E. Lindsay, H. Stewart, A. Gray and C. P. Downes (2003). "Redox regulation of PI 3-kinase signalling via inactivation of PTEN." Embo J **22**(20): 5501-10.
- Lin, J., C. Handschin and B. M. Spiegelman (2005a). "Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators." Cell Metab **1**(6): 361-70.
- Lin, J., R. Yang, P. T. Tarr, P. H. Wu, C. Handschin, S. Li, W. Yang, L. Pei, M. Uldry, P. Tontonoz, C. B. Newgard and B. M. Spiegelman (2005b). "Hyperlipidemic effects of dietary saturated fats mediated through PGC-1beta coactivation of SREBP." Cell **120**(2): 261-73.
- Liu, X., M. Rossmeisl, J. McClaine, M. Riachi, M. E. Harper and L. P. Kozak (2003). "Paradoxical resistance to diet-induced obesity in UCP1-deficient mice." J Clin Invest **111**(3): 399-407.
- Lowell, B. B. and G. I. Shulman (2005). "Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes." Science **307**(5708): 384-7.
- Lowell, B. B. and B. M. Spiegelman (2000). "Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis." Nature **404**(6778): 652-60.
- Ma, S. W. and D. O. Foster (1989). "Brown adipose tissue, liver, and diet-induced thermogenesis in cafeteria diet-fed rats." Can J Physiol Pharmacol **67**(4): 376-81.
- Marra, F. and C. Bertolani (2009). "Adipokines in liver diseases." Hepatology **50**(3): 957-69.

Marra, F., A. Gastaldelli, G. Svegliati Baroni, G. Tell and C. Tiribelli (2008). "Molecular basis and mechanisms of progression of non-alcoholic steatohepatitis." Trends Mol Med **14**(2): 72-81.

Martin, M. E., Y. Chinenov, M. Yu, T. K. Schmidt and X. Y. Yang (1996). "Redox regulation of GA-binding protein-alpha DNA binding activity." J Biol Chem **271**(41): 25617-23.

Masters, B. S., L. L. Stohl and D. A. Clayton (1987). "Yeast mitochondrial RNA polymerase is homologous to those encoded by bacteriophages T3 and T7." Cell **51**(1): 89-99.

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): 609-22.

McCarthy, A. M. and J. S. Elmendorf (2007). "GLUT4's itinerary in health & disease." Indian J Med Res **125**(3): 373-88.

McCulloch, V. and G. S. Shadel (2003). "Human mitochondrial transcription factor B1 interacts with the C-terminal activation region of h-mtTFA and stimulates transcription independently of its RNA methyltransferase activity." Mol Cell Biol **23**(16): 5816-24.

McTernan, P. G., C. M. Kusminski and S. Kumar (2006). "Resistin." Curr Opin Lipidol **17**(2): 170-5.

Memon, R. A., G. S. Hotamisligil, S. M. Wiesbrock, K. T. Uysal, R. Faggioni, A. H. Moser, K. R. Feingold and C. Grunfeld (2000). "Upregulation of uncoupling protein 2 mRNA in genetic obesity: lack of an essential role for leptin, hyperphagia, increased tissue lipid content, and TNF-alpha." Biochim Biophys Acta **1484**(1): 41-50.

Mercer, S. W. and P. Trayhurn (1987). "Effect of high fat diets on energy balance and thermogenesis in brown adipose tissue of lean and genetically obese ob/ob mice." J Nutr **117**(12): 2147-53.

Michael, M. D., R. N. Kulkarni, C. Postic, S. F. Previs, G. I. Shulman, M. A. Magnuson and C. R. Kahn (2000). "Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction." Mol Cell **6**(1): 87-97.

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): 1118-23.

Milanesi, L., A. Russo de Boland and R. Boland (2008). "Expression and localization of estrogen receptor alpha in the C2C12 murine skeletal muscle cell line." J Cell Biochem **104**(4): 1254-73.

Monje, P., S. Zanello, M. Holick and R. Boland (2001). "Differential cellular localization of estrogen receptor alpha in uterine and mammary cells." Mol Cell Endocrinol **181**(1-2): 117-29.

Moraes, C. T. (2001). "What regulates mitochondrial DNA copy number in animal cells?" Trends Genet **17**(4): 199-205.

Morino, K., K. F. Petersen, S. Dufour, D. Befroy, J. Frattini, N. Shatzkes, S. Neschen, M. F. White, S. Bilz, S. Sono, M. Pypaert and G. I. Shulman (2005). "Reduced mitochondrial density and increased IRS-1 serine phosphorylation in muscle of insulin-resistant offspring of type 2 diabetic parents." J Clin Invest **115**(12): 3587-93.

Muraoka, M., A. Fukushima, S. Viengchareun, M. Lombes, F. Kishi, A. Miyauchi, M. Kanematsu, J. Doi, J. Kajimura, R. Nakai, T. Uebi, M. Okamoto and H. Takemori (2009). "Involvement of SIK2/TORC2 signaling cascade in the regulation of insulin-induced PGC-1 α and UCP-1 gene expression in brown adipocytes." Am J Physiol Endocrinol Metab **296**(6): E1430-9.

Myers, S. J., J. Peters, Y. Huang, M. B. Comer, F. Barthel and R. Dingledine (1998). "Transcriptional regulation of the GluR2 gene: neural-specific expression, multiple promoters, and regulatory elements." J Neurosci **18**(17): 6723-39.

Nedergaard, J. and B. Cannon (2010). "The changed metabolic world with human brown adipose tissue: therapeutic visions." Cell Metab **11**(4): 268-72.

Nicholls, D., S. Cunningham and H. Wiesinger (1986). "Mechanisms of thermogenesis in brown adipose tissue." Biochem Soc Trans **14**(2): 223-5.

Nicholls, D. G. (1974). "Hamster brown-adipose-tissue mitochondria. The control of respiration and the proton electrochemical potential gradient by possible physiological effectors of the proton conductance of the inner membrane." Eur J Biochem **49**(3): 573-83.

Nisoli, E., E. Clementi, S. Moncada and M. O. Carruba (2004). "Mitochondrial biogenesis as a cellular signaling framework." Biochem Pharmacol **67**(1): 1-15.

Nisoli, E., C. Tonello, A. Cardile, V. Cozzi, R. Bracale, L. Tedesco, S. Falcone, A. Valerio, O. Cantoni, E. Clementi, S. Moncada and M. O. Carruba (2005). "Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS." Science **310**(5746): 314-7.

Ono, H., H. Shimano, H. Katagiri, N. Yahagi, H. Sakoda, Y. Onishi, M. Anai, T. Ogihara, M. Fujishiro, A. Y. Viana, Y. Fukushima, M. Abe, N. Shojima, M. Kikuchi, N. Yamada, Y. Oka and T. Asano (2003). "Hepatic Akt activation induces marked hypoglycemia, hepatomegaly, and hypertriglyceridemia with sterol regulatory element binding protein involvement." Diabetes **52**(12): 2905-13.

Ostronoff, L. K., J. M. Izquierdo, J. A. Enriquez, J. Montoya and J. M. Cuezva (1996). "Transient activation of mitochondrial translation regulates the expression of the mitochondrial genome during mammalian mitochondrial differentiation." Biochem J **316** (Pt 1): 183-91.

Prada, P. O., H. G. Zecchin, A. L. Gasparetti, M. A. Torsoni, M. Ueno, A. E. Hirata, M. E. Corezola do Amaral, N. F. Hoer, A. C. Boschero and M. J. Saad (2005). "Western diet modulates insulin signaling, c-Jun N-terminal kinase activity, and insulin receptor

substrate-1ser307 phosphorylation in a tissue-specific fashion." Endocrinology **146**(3): 1576-87.

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.

Puigserver, P., Z. Wu, C. W. Park, R. Graves, M. Wright and B. M. Spiegelman (1998). "A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis." Cell **92**(6): 829-39.

Quevedo, S., P. Roca, C. Pico and A. Palou (1998). "Sex-associated differences in cold-induced UCP1 synthesis in rodent brown adipose tissue." Pflugers Arch **436**(5): 689-95.

Rabe, K., M. Lehrke, K. G. Parhofer and U. C. Broedl (2008). "Adipokines and insulin resistance." Mol Med **14**(11-12): 741-51.

Randle, P. J., P. B. Garland, E. A. Newsholme and C. N. Hales (1965). "The glucose fatty acid cycle in obesity and maturity onset diabetes mellitus." Ann N Y Acad Sci **131**(1): 324-33.

Randle, P. J., E. A. Newsholme and P. B. Garland (1964). "Regulation of glucose uptake by muscle. 8. Effects of fatty acids, ketone bodies and pyruvate, and of alloxan-diabetes and starvation, on the uptake and metabolic fate of glucose in rat heart and diaphragm muscles." Biochem J **93**(3): 652-65.

Reaven, G. M. (1988). "Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease." Diabetes **37**(12): 1595-607.

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.

Rehmark, S., A. C. Bianco, J. D. Kieffer and J. E. Silva (1992). "Transcriptional and posttranscriptional mechanisms in uncoupling protein mRNA response to cold." Am J Physiol **262**(1 Pt 1): E58-67.

Richter, C., J. W. Park and B. N. Ames (1988). "Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(17): 6465-7.

Roberti, M., C. Musicco, P. L. Polosa, M. N. Gadaleta and P. Cantatore (1996). "DNA-helicase activity from sea urchin mitochondria." Biochem Biophys Res Commun **219**(1): 134-9.

Roden, M., T. B. Price, G. Perseghin, K. F. Petersen, D. L. Rothman, G. W. Cline and G. I. Shulman (1996). "Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans." J Clin Invest **97**(12): 2859-65.

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): 42958-63.

Roy, E. J. and G. N. Wade (1977). "Role of food intake in estradiol-induced body weight changes in female rats." Horm Behav **8**(3): 265-74.

Rudich, A., H. Kanety and N. Bashan (2007). "Adipose stress-sensing kinases: linking obesity to malfunction." Trends Endocrinol Metab **18**(8): 291-9.

Ruiz-Larrea, M. B., A. M. Leal, C. Martin, R. Martinez and M. Lacort (1997). "Antioxidant action of estrogens in rat hepatocytes." Rev Esp Fisiol **53**(2): 225-9.

Sabio, G., M. Das, A. Mora, Z. Zhang, J. Y. Jun, H. J. Ko, T. Barrett, J. K. Kim and R. J. Davis (2008). "A stress signaling pathway in adipose tissue regulates hepatic insulin resistance." Science **322**(5907): 1539-43.

Saito, M., Y. Okamatsu-Ogura, M. Matsushita, K. Watanabe, T. Yoneshiro, J. Nio-Kobayashi, T. Iwanaga, M. Miyagawa, T. Kameya, K. Nakada, Y. Kawai and M. Tsujisaki (2009). "High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of cold exposure and adiposity." Diabetes **58**(7): 1526-31.

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): 1446-52.

Scarpulla, R. C. (2006). "Nuclear control of respiratory gene expression in mammalian cells." J Cell Biochem **97**(4): 673-83.

Scarpulla, R. C. (2008). "Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function." Physiol Rev **88**(2): 611-38.

Schubert, M., D. P. Brazil, D. J. Burks, J. A. Kushner, J. Ye, C. L. Flint, J. Farhang-Fallah, P. Dikkes, X. M. Warot, C. Rio, G. Corfas and M. F. White (2003). "Insulin receptor substrate-2 deficiency impairs brain growth and promotes tau phosphorylation." J Neurosci **23**(18): 7084-92.

Sekeris, C. E. (1990). "The mitochondrial genome: a possible primary site of action of steroid hormones." In Vivo **4**(5): 317-20.

Shadel, G. S. and D. A. Clayton (1997). "Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates." Annu Rev Biochem **66**: 409-35.

Shulman, G. I. (2000). "Cellular mechanisms of insulin resistance." J Clin Invest **106**(2): 171-6.

Silvestri, E., L. Schiavo, A. Lombardi and F. Goglia (2005). "Thyroid hormones as molecular determinants of thermogenesis." Acta Physiol Scand **184**(4): 265-83.

Skurk, T., C. Alberti-Huber, C. Herder and H. Hauner (2007). "Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion." J Clin Endocrinol Metab **92**(3): 1023-33.

- Slawik, M. and A. J. Vidal-Puig (2006). "Lipotoxicity, overnutrition and energy metabolism in aging." Ageing Res Rev **5**(2): 144-64.
- Song, R. X., R. A. McPherson, L. Adam, Y. Bao, M. Shupnik, R. Kumar and R. J. Santen (2002). "Linkage of rapid estrogen action to MAPK activation by ERalpha-Shc association and Shc pathway activation." Mol Endocrinol **16**(1): 116-27.
- Sonoda, J., J. Laganriere, I. R. Mehl, G. D. Barish, L. W. Chong, X. Li, I. E. Scheffler, D. C. Mock, A. R. Bataille, F. Robert, C. H. Lee, V. Giguere and R. M. Evans (2007). "Nuclear receptor ERR alpha and coactivator PGC-1 beta are effectors of IFN-gamma-induced host defense." Genes Dev **21**(15): 1909-20.
- Stirone, C., S. P. Duckles, D. N. Krause and V. Procaccio (2005). "Estrogen increases mitochondrial efficiency and reduces oxidative stress in cerebral blood vessels." Mol Pharmacol **68**(4): 959-65.
- 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): 41510-8.
- Sun, X. J., P. Rothenberg, C. R. Kahn, J. M. Backer, E. Araki, P. A. Wilden, D. A. Cahill, B. J. Goldstein and M. F. White (1991). "Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein." Nature **352**(6330): 73-7.
- Tamasi, V., J. M. Jeffries, G. E. Arteel and K. C. Falkner (2004). "Ebselen augments its peroxidase activity by inducing nrf-2-dependent transcription." Arch Biochem Biophys **431**(2): 161-8.
- Tamemoto, H., T. Kadowaki, K. Tobe, T. Yagi, H. Sakura, T. Hayakawa, Y. Terauchi, K. Ueki, Y. Kaburagi, S. Satoh and et al. (1994). "Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1." Nature **372**(6502): 182-6.
- Teede, H. J., C. Lombard and A. A. Deeks (2010). "Obesity, metabolic complications and the menopause: an opportunity for prevention." Climacteric **13**(3): 203-9.
- Terada, S., K. Kawanaka, M. Goto, T. Shimokawa and I. Tabata (2005). "Effects of high-intensity intermittent swimming on PGC-1alpha protein expression in rat skeletal muscle." Acta Physiol Scand **184**(1): 59-65.
- Thannickal, V. J. and B. L. Fanburg (2000). "Reactive oxygen species in cell signaling." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **279**(6): L1005-28.
- Thomas-Moya, E., A. Nadal-Casellas, M. Gianotti, I. Llado and A. M. Proenza (2007). "Time-dependent modulation of rat serum paraoxonase 1 activity by fasting." Pflugers Arch **453**(6): 831-7.
- Topper, J. N. and D. A. Clayton (1989). "Identification of transcriptional regulatory elements in human mitochondrial DNA by linker substitution analysis." Mol Cell Biol **9**(3): 1200-11.
- Tschopp, O., Z. Z. Yang, D. Brodbeck, B. A. Dummmler, M. Hemmings-Mieszczak, T. Watanabe, T. Michaelis, J. Frahm and B. A. Hemmings (2005). "Essential role of

protein kinase B gamma (PKB gamma/Akt3) in postnatal brain development but not in glucose homeostasis." Development **132**(13): 2943-54.

Tulp, O. L., R. Frink and E. Danforth, Jr. (1982). "Effect of cafeteria feeding on brown and white adipose tissue cellularity, thermogenesis, and body composition in rats." J Nutr **112**(12): 2250-60.

Uldry, M., W. Yang, J. St-Pierre, J. Lin, P. Seale and B. M. Spiegelman (2006). "Complementary action of the PGC-1 coactivators in mitochondrial biogenesis and brown fat differentiation." Cell Metab **3**(5): 333-41.

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): 2791-8.

Valverde, A. M., M. Arribas, C. Mur, P. Navarro, S. Pons, A. M. Cassard-Doulcier, C. R. Kahn and M. Benito (2003). "Insulin-induced up-regulated uncoupling protein-1 expression is mediated by insulin receptor substrate 1 through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway in fetal brown adipocytes." J Biol Chem **278**(12): 10221-31.

Valverde, A. M., M. Benito and M. Lorenzo (2005). "The brown adipose cell: a model for understanding the molecular mechanisms of insulin resistance." Acta Physiol Scand **183**(1): 59-73.

Valverde, A. M., M. Lorenzo, S. Pons, M. F. White and M. Benito (1998). "Insulin receptor substrate (IRS) proteins IRS-1 and IRS-2 differential signaling in the insulin/insulin-like growth factor-I pathways in fetal brown adipocytes." Mol Endocrinol **12**(5): 688-97.

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): C1302-8.

Vallejo, C. G., H. Escriva and A. Rodriguez-Pena (2000). "Evidence of tissue-specific, post-transcriptional regulation of NRF-2 expression." Biochimie **82**(12): 1129-33.

van Dam, E. M., R. Govers and D. E. James (2005). "Akt activation is required at a late stage of insulin-induced GLUT4 translocation to the plasma membrane." Mol Endocrinol **19**(4): 1067-77.

van Herpen, N. A. and V. B. Schrauwen-Hinderling (2008). "Lipid accumulation in non-adipose tissue and lipotoxicity." Physiol Behav **94**(2): 231-41.

van Weeren, P. C., K. M. de Bruyn, A. M. de Vries-Smits, J. van Lint and B. M. Burgering (1998). "Essential role for protein kinase B (PKB) in insulin-induced

glycogen synthase kinase 3 inactivation. Characterization of dominant-negative mutant of PKB." *J Biol Chem* **273**(21): 13150-6.

Viña, J., C. Borrás, J. Gambini, J. Sastre and F. V. Pallardo (2005). "Why females live longer than males? Importance of the upregulation of longevity-associated genes by oestrogenic compounds." *FEBS Lett* **579**(12): 2541-5.

Viña, 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): 1369-74.

Viña, J., J. Sastre, F. V. Pallardo, J. Gambini and C. Borrás (2006). "Role of mitochondrial oxidative stress to explain the different longevity between genders: protective effect of estrogens." *Free Radic Res* **40**(12): 1359-65.

Virbasius, C. A., J. V. Virbasius and R. C. Scarpulla (1993a). "NRF-1, an activator involved in nuclear-mitochondrial interactions, utilizes a new DNA-binding domain conserved in a family of developmental regulators." *Genes Dev* **7**(12A): 2431-45.

Virbasius, J. V., C. A. Virbasius and R. C. Scarpulla (1993b). "Identity of GABP with NRF-2, a multisubunit activator of cytochrome oxidase expression, reveals a cellular role for an ETS domain activator of viral promoters." *Genes Dev* **7**(3): 380-92.

Virkamaki, A., K. Ueki and C. R. Kahn (1999). "Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance." *J Clin Invest* **103**(7): 931-43.

Virtanen, K. A., M. E. Lidell, J. Orava, M. Heglind, R. Westergren, T. Niemi, M. Taittonen, J. Laine, N. J. Savisto, S. Enerback and P. Nuutila (2009). "Functional brown adipose tissue in healthy adults." *N Engl J Med* **360**(15): 1518-25.

Virtue, S. and A. Vidal-Puig (2010). "Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome--an allostatic perspective." *Biochim Biophys Acta* **1801**(3): 338-49.

White, M. F. (2003). "Insulin signaling in health and disease." *Science* **302**(5651): 1710-1.

White, M. F., R. Maron and C. R. Kahn (1985). "Insulin rapidly stimulates tyrosine phosphorylation of a Mr-185,000 protein in intact cells." *Nature* **318**(6042): 183-6.

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): 115-24.

Ye, P., M. Yoshioka, L. Gan and J. St-Amand (2005). "Regulation of global gene expression by ovariectomy and estrogen in female adipose tissue." *Obes Res* **13**(6): 1024-30.

Yoshioka, K., T. Yoshida, Y. Wakabayashi, H. Nishioka and M. Kondo (1988). "Reduced brown adipose tissue thermogenesis of obese rats after ovariectomy." Endocrinol Jpn **35**(4): 537-43.

Young, J. B., E. Saville, N. J. Rothwell, M. J. Stock and L. Landsberg (1982). "Effect of diet and cold exposure on norepinephrine turnover in brown adipose tissue of the rat." J Clin Invest **69**(5): 1061-71.

Yun, S. J., E. K. Kim, D. F. Tucker, C. D. Kim, M. J. Birnbaum and S. S. Bae (2008). "Isoform-specific regulation of adipocyte differentiation by Akt/protein kinase Balpha." Biochem Biophys Res Commun **371**(1): 138-43.

Zhou, L. Z., A. P. Johnson and T. A. Rando (2001). "NF kappa B and AP-1 mediate transcriptional responses to oxidative stress in skeletal muscle cells." Free Radic Biol Med **31**(11): 1405-16.

Zingaretti, M. C., F. Crosta, A. Vitali, M. Guerrieri, A. Frontini, B. Cannon, J. Nedergaard and S. Cinti (2009). "The presence of UCP1 demonstrates that metabolically active adipose tissue in the neck of adult humans truly represents brown adipose tissue." Faseb J **23**(9): 3113-20.

**7. ANNEX 1. RESULTATS NO
INCLOSOS EN ELS MANUSCRITS**

ANNEX 1. RESULTATS NO INCLOSOS EN ELS MANUSCRITS

A les taules següents resumim les diferències de sexe trobades en els elements de la via de senyalització de la insulina i del procés de biogènesi mitocondrial en el TAM dels animals control usats en el model d'estudi d'obesitat dietètica (rates de 36 setmanes d'edat). Aquests resultats complementen els que recollim en el manuscrit II.

Taula 1. Nivells de proteïnes implicades en la via de senyalització de la insulina i del receptor adrenèrgic β_3

IR β , subunitat β del receptor de la insulina; Glut4, transportador de glucosa de tipus 4; β_3 -AR, receptor adrenèrgic β_3 ; PI3K, fosfatidilinositol 3 cinasa. Consideram el 100% d'expressió els nivells de proteïnes de grup de mascles control. Les dades representen la mitjana \pm l'error tipus per sis animals en cada grup experimental. A la prova *t* de Student ($p < 0.05$), *a* indica que és diferent del grup de mascles control.

	Mascles control	Femelles control
IRβ (U.A./g teixit)	100 \pm 12	301 \pm 26 ^a
Glut-4 (U.A./g teixit)	100 \pm 19	218 \pm 30 ^a
β_3-AR (U.A./g teixit)	100 \pm 25	290 \pm 45 ^a
p-PI3K/PI3K (U.A.)	26,1 \pm 1,4	25,5 \pm 2,2

Taula 2. Nivells de l'ARNm del gen PGC-1 α i de proteïnes implicades en la biogènesi mitocondrial

PGC-1 α , coactivador del receptor activat per proliferadors peroxisomals gamma 1 α ; TFAM, factor de transcripció mitocondrial A; COX IV, subunitat IV de la citocrom *c* oxidasa. Consideram el 100% d'expressió els nivells de proteïnes de grup de mascles control. Les dades representen la mitjana \pm l'error tipus per sis animals en cada grup experimental. A la prova *t* de Student ($p < 0.05$), *a* indica que és diferent del grup de mascles control.

	Mascles control	Femelles control
PGC-1α (U.A.)	3,03 \pm 0,57	2,71 \pm 0,30
TFAM (U.A./g teixit)	100 \pm 10	246 \pm 19 ^a
COX IV (U.A./g teixit)	100 \pm 14	198 \pm 18 ^a

8. ANNEX 2: PUBLICACIONS COMPLEMENTÀRIES

Manuscrit VI

Time-dependent modulation of rat serum paraoxonase 1 activity by fasting

Thomàs-Moyà E, **Nadal-Casellas** A, Gianotti M, Lladó I, Proenza AM.

Pflugers Arch. 453(6):831-7, 2007

Manuscrit VII

Phytotherapy in a rat model of hyperoxaluria: the antioxidant effects of quercetin involve serum paraoxonase 1 activation

Amengual-Cladera E, **Nadal-Casellas** A, Gómez-Pérez Y, Gomila I, Prieto RM, Proenza AM, Lladó I.

Exp Biol Med (Maywood) 236(10):1133-8, 2011

Tenc es padrí glossador
i en pegar sempre endevina,
jo som manacorina
i ho som amb molt d'honor.

Quan veig aquest ardor
que el llevant mos envia,
per res del món barataria
de Mallorca aquest racó

El meu padrí Toni

