



Universitat
de les Illes Balears

TESI DOCTORAL
2015

**EFFECTES DELS ESTRÒGENS EN LA FUNCIO I
LA BIOGENESI MITOCONDRIALS CARDIAQUES.
INFLUENCIA DE L'ENTORN LIPOTOXIC**

Miquel Sbert Roig



Universitat
de les Illes Balears

TESI DOCTORAL
2015

Programa de Doctorat en Nutrició Humana

**EFFECTES DELS ESTRÒGENS EN LA FUNCIO I
LA BIOGENESI MITOCONDRIALS CARDIAQUES.
INFLUÈNCIA DE L'ENTORN LIPOTÒXIC**

Miquel Sbert Roig

Directores:

Dra. Magdalena Gianotti Bauzá
Dra. Ana María Proenza Arenas

Doctor per la Universitat de les Illes Balears

Amb el vistiplau de les Directores

Dra. Magdalena Gianotti Bauzà
Catedràtica d'Universitat

Dra. Ana María Proenza Arenas
Professora Titular d'Universitat

Àrea de Bioquímica i Biologia Molecular
Dept. Biologia Fonamental i Ciències de la Salut

L'interessat

Miquel Sbert Roig



**Universitat de les
Illes Balears**

Dra. Magdalena Gianotti Bauzà, de la Universitat de les Illes Balears

DECLARO:

Que la tesi doctoral que porta per títol *Efectes dels estrògens en la funció i la biogènesi mitocondrials cardíacaques. Influència de l'entorn lipotòxic*, presentada pel senyor Miquel Sbert Roig per a l'obtenció del títol de doctor, ha estat dirigida sota la meva supervisió i que compleix amb els requisits necessaris per optar al títol de Doctor Europeu.

I perquè quedi constància d'això signo aquest document.

Palma de Mallorca, 19 de novembre de 2015.



**Universitat de les
Illes Balears**

Dra. Ana María Proenza Arenas, de la Universitat de les Illes Balears

DECLARO:

Que la tesi doctoral que porta per títol *Efectes dels estrògens en la funció i la biogènesi mitocondrials cardíaques. Influència de l'entorn lipotòxic*, presentada pel senyor Miquel Sbert Roig per a l'obtenció del títol de doctor, ha estat dirigida sota la meva supervisió i que compleix amb els requisits necessaris per optar al títol de Doctor Europeu.

I perquè quedi constància d'això signo aquest document.

Palma de Mallorca, 19 de novembre de 2015.

*Als meus padrins,
víctimes d'una postguerra on estudiar estava a l'abast de poca gent,
i que, encara que no poden o no podrien entendre el que he fet,
sé que estan o estarien orgullosos de jo*

Cerca la tesi doctoral, que és molt enfora.

Per arribar-hi han de passar un camp de formigues, que en negretja i que farien morir rabiós es qui hi entràs; llavors un camp d'animals feroços que, si hi afinassen ningú, no hi hauria bocinada perhom; i llavors un camp on hi ha una serp de set caps, més afectada d'homos que un gat de formatge, i que los se passaria sencers!

I si a un cas de casos n'hi hagués cap que passàs, llavors se trobaria amb una murada de setanta pams d'alt que tanca un jardí i només hi ha un portal amb unes portes de bronze que sempre s'obrin i se tanquen ben aviades i amb tanta força que en farien una coca de s'atrevit que s'atansàs a passar.

Passat tot això encara hi som noltros, set gegants de dia i set de nit, ajaguts abaix del taronger que té l'amor de les tres taronges en es brot de més amunt.

Adaptat de L'amor de les tres taronges, rondalla popular recopilada per Jordi d'Es Racó (Mn. Antoni Maria Alcover)

AGRAÏMENTS

Diuen que una persona, al llarg de la seva vida, ha d'escriure un llibre, ha de sembrar un arbre i ha de tenir fills. D'arbres ja n'he sembrat, i ara podré dir que hauré escrit un llibre. Els fills... ja arribaran algun dia.

En primer lloc he d'agrair haver pogut escriure aquest llibre a les meves dues directores, la doctora Ana María Proenza i la doctora Magdalena Gianotti, per la seva ajuda, orientació, entrega i experiència que m'han donat dia a dia durant aquests més de quatre anys, especialment a les darreres etapes de la tesi a les quals han dedicat gran part del seu temps en fer possible que aquesta tesi sortís a la llum. També vull donar les gràcies al doctor Paco García per les seves grans lliçons metabòliques, i a la doctora Isabel Lladó pels seus comentaris i consells bioquímics, així com als doctors Pilar Roca, Jordi Oliver i Ádamo Valle per oferir-me la seva ajuda sempre que l'he necessitada.

Vull fer una menció especial al Dr. Ian Salt, de la Universitat de Glasgow, i a tot el seu equip investigador, per haver-me donat l'oportunitat de conèixer un altre grup de recerca que, de ben segur, m'ha permès madurar com a investigador. Això sense oblidar els *tours* que vàrem fer plegats per conèixer aquesta esplèndida ciutat.

Tot això no hagués estat possible sense els meus companys de laboratori, presents i passats, que, encara que ho intenti, no hi ha manera d'agrair els bons moments de tots aquests anys i l'ajuda en els no tan bons. Sense ells Destacar en primer lloc a en Marco i na Bel, culpables en gran part de que aquesta tesi sigui una realitat, especialment a les acaballes on s'han fet càrrec d'un bon grapat de *westerns* i de manteniments de cèl·lules, i són com els enzims antioxidants d'un mitocondri: sense ells aquesta tesi estaria oxidada. A més, gràcies a ells no he estat tot sol quan feia el cafè del matí i vaig aprendre que era el *comunio*. Aquesta tesi és tan meva com seva. Na Gabriela ha estat una persona gràcies a la qual he après moltíssimes coses dins el laboratori, i

amb la que guard molt bons records dins l'estabulari. No sé com ho haguéssim fet sense ella amb tantes rates! Una de les principals contribucions d'aquesta tesi i de la que no en quedarà constància enlloc és que he après una gran dinàmica de treball en equip que ha estat possible gràcies a totes aquestes persones. No en vull oblidar d'en Jordi, que també ha estat el meu gran mestre del laboratori, una persona capaç de solucionar un problema sense solució i que sempre te fa dibuixar una rialla amb qualsevol doi. A en Dani, un company molt *gefo* que ha fet que aquesta tesi fos un poc més *tràmbol*. A na Maria del Mar, una *portenya* que te fa riure molt amb els seus comentaris desprevinguts. A na Mercedes, per introduir-me a les paelles de *Can Gavella*. A en Xavi, per ser un autèntic culé fins el darrer pèl dels bigots. A en Miquelot, que d'aquí poc serà el millor investigador de Xile. A na Carla, per oblidar-me constantment del seu nom. A na Lida, la crack de les FPU. I també a les persones que quan vaig trepitjar per primera vegada el laboratori me varen acollir: n'Antònia Nadal, n'Emi, na Yolanda i n'Antònia Mestre.

Quan vaig acabar la carrera vaig saber que volia fer una tesi doctoral, i he estat afortunat de poder fer el que vaig voler. En canvi, hi ha moltes persones que no han tengut la mateixa sort i són víctimes d'un model de societat, crisi econòmica de banda, on la ignorància està millor valorada que el coneixement. Vull dedicar la meva tesi doctoral a totes aquestes persones amb el desig de que algun dia això canviï i hi hagi més oportunitats per a tota aquella gent que s'ho mereix.

Haver tengut l'oportunitat no només de fer la tesi doctoral, sinó també d'haver pogut estudiar una carrera universitària, ha estat gràcies als meus pares, Maria i Miquel, als quals de d'agrair principalment que m'ensenyessin a valorar que, per a que les coses surtin, s'han de suar. Als meus sogres, Jerònia i Mateu, pels ànims constants que m'han donat. A na Xisca, la meva germana, de la que sempre he rebut bons consells i recolzament. Als meus cunyats Maria, Joan i Miquel per ser alhora bons amics meus i sempre preocupar-se

per mi. Als que no hi eren quan vaig començar la tesis, en Marc, na Maria i na Mel, que em fa molt content que al final si que hi siguin.

El darrer agraïment va per l'autora (gratuïta) dels dibuixos presents en aquesta tesi. Sense el seu suport, especialment en les èpoques més dures de feina, no sé com ho hagués fet. Descobrir Escòcia sense ella hagués estat tan solitari com un anticòs sense el seu antígen. És l'enzim que catalitza la meva vida. Amb ella he sembrat arbres i he escrit aquest llibre. La història continuarà.

Aquesta tesi doctoral s'ha portat a terme en el Grup de Metabolisme Energètic i Nutrició del Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut de la Universitat de les Illes Balears. Aquest grup d'investigació és membre de l'Institut Universitari d'Investigació en Ciències de la Salut (IUNICS) de la Universitat de les Illes Balears, del Centre d'Investigacions Biomèdiques en Xarxa de Fisiopatologia de l'Obesitat i la Nutrició (CIBERObn) de l'Institut Carlos III (CB06/03/0043), i de l'Institut d'Investigació Sanitària de Palma (IdISPa). Aquest treball ha estat possible gràcies als projectes d'investigació finançats per la Direcció General d'Investigació i Gestió del Pla Nacional de I+D+I (SAF2010-21792) del Govern Espanyol, i per ajudes de la Comunitat Autònoma de les Illes Balears cofinançades amb els fons FEDER (31/2011, AAEE002/2012, AAEE43/2014). El doctorant ha disposat d'una beca predoctoral concedida per la Conselleria d'Educació, Cultura i Universitats del Govern de les Illes Balears, després de ser seleccionat dins un marc d'un programa operatiu cofinançat pel Fons Social Europeu.



Universitat
de les Illes Balears



Unió Europea

Fons Europeu de Desenvolupament Regional
Una manera de fer Europa



Govern
de les Illes Balears

Conselleria d'Educació,
Cultura i Universitats



Unió Europea
1954 2004 2007

Índex

SIGLES I ACRÒNIMS	V
RESUM	IX
PUBLICACIONS DERIVADES DE LA TESI DOCTORAL.....	XV
1. INTRODUCCIÓ	1
1.1. Metabolisme energètic cardíac	3
1.1.1. Metabolisme lipídic cardíac	3
1.1.2. Metabolisme glucídic cardíac.....	5
1.1.3. Funció i biogènesi mitocondrials.....	6
1.1.3.1. Transcripció i replicació del genoma mitocondrial	9
1.1.3.2. Transcripció de gens nuclears per a proteïnes mitocondrials	10
1.1.3.3. Dinàmica mitocondrial.....	14
1.1.4. Els mitocondris com a font de radicals lliures d'oxigen (ROS)	15
1.1.5. Diferències entre sexes en la funció i la biogènesi mitocondrials: paper dels estrògens	19
1.1.5.1. Els estrògens i els seus receptors	20
1.1.5.2. Efectes dels estrògens sobre el metabolisme energètic	22
1.2. Lipotoxicitat cardíaca	24
1.2.1. La disfunció del teixit adipós com a causa de la lipotoxicitat cardíaca.....	24
1.2.2. Fallida metabòlica del cor lipotòxic.....	26
1.2.3. Inflamació al cor lipotòxic.....	29
1.2.4. Paper protector de l'AMPK en la lipotoxicitat cardíaca.....	30
1.2.4.1. L'adiponectina com a activador fisiològic de l'AMPK.....	32
1.2.4.2. L'AMPK com a diana terapèutica.....	33
2. OBJECTIUS I PLANTEJAMENT EXPERIMENTAL.....	35
3. MATERIALS I MÈTODES.....	43
3.1. Estudis <i>in vivo</i>.....	45
3.1.1. Animals i tractaments	45
3.1.1.1. Experiment amb rates ovariectomitzades.....	45
3.1.1.2. Experiment amb rates alimentades amb dieta hiperlipídica.....	47
3.1.2. Determinació de la tolerància a la glucosa	48
3.1.3. Determinació dels paràmetres circulants.....	49
3.1.4. Preparació dels homogenats de múscul cardíac	50
3.1.5. Permeabilització de miofibres cardíacques	50
3.1.6. Obtenció del RNA.....	52
3.1.7. Obtenció del DNA.....	53
3.1.8. Digestió amb NaOH	53
3.2. Estudis amb cardiomiòcits H9c2	55
3.2.1. Característiques dels cardiomiòcits H9c2.....	55

3.2.2. Procediments generals de cultius.....	55
3.2.2.1. Manteniment i subcultiu.....	55
3.2.2.2. Congelació i descongelació	56
3.2.2.3. Diferenciació.....	57
3.2.2.4. Anàlisi de la contaminació per micoplasma	58
3.2.3. Tractaments	58
3.2.4. Recollides de mostres per a Western blot i per obtenció del RNA.....	60
3.2.5. Anàlisi de la viabilitat cel·lular.....	61
3.3. Estudis amb cèl·lules endotelials de vena de cordó umbilical humana	62
3.3.1. Metodologia general del cultiu de HUVECs	62
3.3.2. Transfecció mitjançant adenovirus.....	62
3.3.3. Tractaments	63
3.3.4. Recollida de cèl·lules	64
3.4. Metodologia general.....	65
3.4.1. Mesura del consum d'oxigen a miofibres permeabilitzades	65
3.4.2. Mesura de la producció de H ₂ O ₂ a miofibres permeabilitzades.....	66
3.4.3. Determinació de la concentració de proteïnes	66
3.4.3.1. Mètode de Bradford.....	66
3.4.3.2. Mètode de l'àcid bicinconínic (BCA)	67
3.4.4. Determinació de la concentració de DNA.....	68
3.4.5. Determinació dels nivells de triglicèrids cardíacs	68
3.4.6. Anàlisi de la capacitat antioxidant total no enzimàtica (TAC)	69
3.4.7. Determinació semiquantitativa dels nivells de proteïna per Western blot	69
3.4.8. Quantificació dels grups carbonils a proteïnes	75
3.4.9. Determinació de la peroxidació lipídica	76
3.4.10. Determinació de l'expressió gènica.....	76
3.4.10.1. Retrotranscripció.....	76
3.4.10.2. PCR a temps real.....	77
3.4.10.3. Anàlisi de l'eficiència i càlcul de l'expressió gènica	78
3.4.10.4. Confirmació de l'especificitat de l'amplificació	79
3.4.11. Anàlisi de les activitats enzimàtiques	80
3.4.11.1. Determinació de l'activitat citrat sintasa	80
3.4.11.2. Determinació de l'activitat citocrom c oxidasa	81
3.4.11.3. Determinació de l'activitat superòxid dismutasa	83
3.4.11.4. Determinació de l'activitat glutatí peroxidasa.....	85
3.4.12. Tínci immunofluorescent i microscòpia confocal	86
3.4.13. Immunoprecipitació	88
3.5. Anàlisi estadístic	90
Anàlisi estadístic dels resultats de l'experiment amb rates ovariectomitzades	90
Anàlisi estadístic dels resultats de l'experiment amb rates alimentades amb una dieta hiperlipídica.....	90
Anàlisi estadístic dels resultats dels experiments amb cardiomiòcits H9c2.....	90
Anàlisi estadístic dels experiments amb cèl·lules endotelials HUVECs	91
4. RESULTATS I DISCUSSIÓ	93
4.1 Efectes dels estrògens i els seus receptors sobre la funció i la biogènesi mitocondrials i l'estrès oxidatiu al múscul cardíac.....	95

4.1.1. Resultats.....	95
4.1.2. Discussió.....	102
4.2 Dimorfisme sexual en el metabolisme energètic cardíac en condicions lipotòxiques: efecte de la rosiglitazona	107
4.2.1. Resultats.....	107
4.2.2. Discussió.....	119
4.3. Efectes de l'estradiol i l'AMPK sobre les vies inflamatòries de les MAPKs a cardiomiòcits en condicions de lipotoxicitat	125
4.3.1. Resultats.....	126
4.3.2. Discussió.....	129
4.4. Efectes de l'AMPK sobre les vies del NF-κB i de les MAPKs a cèl·lules endotelials.....	133
4.4.1. Resultats i discussió.....	135
5. RECAPITULACIÓ	143
6. CONCLUSIONS.....	153
7. REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES	159

SIGLES I ACRÒNIMS

ACC: acetil-CoA carboxilasa

AdipoR1, AdipoR2: receptors 1 i 2 de l'adiponectina

Akt: proteïna cinasa B

AMPK: cinasa activada per AMP

APPL1: proteïna adaptadora 1 que conté una interacció de fosfotirosines, un domini PH i una cremallera de leucina

BSA: albúmina sèrica bovina

CD36: clúster de diferenciació 36

COX: citocrom *c* oxidasa

COX I, COX IV: subunitats I i IV de la citocrom *c* oxidasa

CPT: transferasa de palmitoilcarnitina

CREB: proteïna d'unió a l'element de resposta a cAMP

DAG: diacilglicerol

DMEM: medi Eagle modificat per Dulbecco

DMSO: dimetilsulfòxid

Drp1: proteïna relacionada amb la dinamina 1

E₂: 17 β -estradiol

eNOS: sintasa d'òxid nítric endotelial

ER α , ER β : receptors d'estrògens α i β

ERE: element de resposta a estrògens

ERK: cinasa activada per senyals extracel·lulars

ERR α , ERR β , ERR γ : receptors relacionats amb estrògens α , β i γ

ETC: cadena de transport electrònic

FABP_{pm}: proteïna d'unió a àcids grassos del plasmalemma

FAT: translocasa d'àcids grassos

FBS: sèrum fetal boví

Fis1: proteïna de fissió 1

GFP: proteïna verda fluorescent

GLUT1, GLUT4: transportadors de glucosa de tipus 1 i 4

GPER: receptor d'estrògens associat a proteïnes G

GPx: glutatió peroxidasa

HFD: dieta hiperlipídica

HOMA-IR: model homeostàtic d'estimació de la resistència a la insulina

HUVECs: cèl·lules endotelials de vena de cordó umbilical humana

I κ B: inhibidor de NF- κ B

IKK: cinasa d'I κ B

IL-1 β , IL-6: interleucines 1 β i 6

IRS1: substrat 1 del receptor de la insulina

JNK: cinasa de l'extrem N-terminal de c-Jun

LKB1: cinasa B1 del fetge

LPS: lipopolisacàrid

MAPKs: cinases activades per mitògens

MCAD: deshidrogenasa d'acils-CoA de cadena mitjana

Mfn1, Mfn2: mitofusines 1 i 2

mtDNA: DNA mitocondrial

NEFAs: Àcids grassos no esterificats

NF- κ B: factor nuclear κ B

NRF1 i NRF2: factors nuclears de respiració 1 i 2

OPA1: proteïna de l'atròfia òptica 1

PA: palmitat

PBS: tampó fosfat salí

PBS-T: PBS amb Tween 20

PDK4: cinasa 4 del complex de la piruvat deshidrogenasa

PGC-1 α , PGC-1 β : Coactivadors 1 α i 1 β del receptor activat per proliferadors peroxisomals γ

PI3K: cinasa del 3-fosfatidilinositol

POLRMT: RNA polimerasa mitocondrial

PPAR α , PPAR β/δ , PPAR γ : receptors activats per proliferadors peroxisomals α , β/δ i γ

PRC: coactivador tipus PGC1- α

PRX3: peroxiredoxina 3

ROS: espècies reactives de l'oxigen

Rsg: rosiglitazona
Sirt1: sirtuïna 1
SOD: superòxid dismutasa
TAB: proteïna d'unió a TAK1
TAC: capacitat antioxidant no enzimàtica total
TAK1: cinasa 1 activada pel factor de creixement transformant β
T-cad: T-cadherina
TFAM: factor de transcripció mitocondrial A
TFB1M, TFB2M: factors de transcripció mitocondrials B1 i B2
TG: triglicèrids
TLR4: receptor de tipus *Toll* 4
TNF- α : factor de necrosi tumoral α
TZD: tiazolidinediones
UCP2, UCP3: proteïnes desacoblants 2 i 3
4-HNE: 4- hidroxinonenal



Universitat
de les Illes Balears

Efectes dels estrògens en la funció i la biogènesi mitocondrials cardíacs. Influència de l'entorn lipotòxic

Tesi doctoral, Miquel Sbert Roig, Grup de Metabolisme Energètic i Nutrició, Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut

RESUM

Estudis previs realitzats pel nostre grup d'investigació han posat de manifest l'existència d'un dimorfisme sexual en la funció i la biogènesi mitocondrials i en l'estrès oxidatiu del múscul cardíac, de forma que les rates femella presenten uns mitocondris més diferenciats i una menor producció de radicals lliures. Tenint en compte aquests antecedents, els objectius d'aquesta tesi doctoral han estat l'estudi de la contribució dels estrògens en aquestes diferències entre sexes, així com dels efectes d'aquestes hormones sobre la lipotoxicitat del miocardi, un desordre metabòlic caracteritzat, entre altres alteracions, per la pèrdua de l'homeòstasi mitocondrial. Per a la consecució d'aquests objectius s'han combinat estudis *in vivo* amb rates Wistar d'ambdós sexes sotmeses a diferents manipulacions hormonals, dietètiques i farmacològiques, i estudis *in vitro* amb cardiomiòcits H9c2 per confirmar els efectes específics dels diferents tractaments.

L'ovariectomia produeix una disminució de la capacitat oxidativa mitocondrial i un increment de l'estrès oxidatiu al miocardi, efectes que són neutralitzats en gran mesura mitjançant l'administració de 17β -estradiol (E_2). Els experiments *in vitro* demostren que aquest efectes de l' E_2 estimulants la biogènesi mitocondrial es donen a través de la seva unió al receptor GPER, la qual cosa reforça la rellevància d'aquest receptor estrogènic com a diana terapèutica per fer front a l'increment del risc de patologia cardíaca en la peri i la post-menopausa.

A rates alimentades amb una dieta hiperlipídica s'observa una major resistència al desenvolupament de lipotoxicitat cardíaca a les femelles, la qual cosa es podria deure als efectes de l'E₂ reduint la disfunció mitocondrial i l'estrès oxidatiu que caracteritzen aquest procés lipotòxic. A més, les femelles mostren una major sensibilitat al tractament amb rosiglitazona, un fàrmac que atenua els efectes lesius de la lipotoxicitat. Aquesta millor resposta metabòlica de les rates femella està associada a una major activació de la proteïna AMPK al cor en comparació amb els mascles, i els nostres resultats *in vitro* demostren una contribució molt important de l'E₂ en aquestes diferències. A més, aquesta hormona redueix l'activació de vies inflamatòries induïda per la lipotoxicitat als cardiomiòcits, encara que, en aquest cas, de forma no dependent de l'AMPK. La importància d'aquesta proteïna com a element antiinflamatori també s'ha vist a cèl·lules endotelials, on hem descrit un nou mecanisme antiinflamatori de l'AMPK que implicaria una disminució de l'activació de la TAK1, una proteïna que activa simultàniament les vies del NF- κ B i de les MAPKs p38 i JNK.

En conjunt, els resultats d'aquesta tesi posen de manifest que els estrògens són importants estimuladors de la funció i la biogènesi mitocondrials cardíques i redueixen l'estrès oxidatiu i l'estat inflamatori d'aquest òrgan. Aquests efectes dels estrògens serien particularment importants en situacions patològiques que comportin alteracions del metabolisme energètic dels cardiomiòcits, com és la lipotoxicitat cardíaca, i, per tant, podrien ser un element clau en el desenvolupament d'estratègies terapèutiques per tractar aquests desordres.



Universitat
de les Illes Balears

Efectos de los estrógenos sobre la función y la biogénesis mitocondriales cardíacas. Influencia del entorno lipotóxico

Tesis doctoral, Miquel Sbert Roig, Grupo de Metabolismo Energético y Nutrición, Departamento de Biología Fundamental y Ciencias de la Salud

RESUMEN

Estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación han puesto de manifiesto la existencia de un dimorfismo sexual en la función y la biogénesis mitocondriales y en el estrés oxidativo del músculo cardíaco, de forma que las ratas hembra presentan unas mitocondrias más diferenciadas y una menor producción de radicales libres. Teniendo en cuenta estos antecedentes, los objetivos de esta tesis doctoral han sido el estudio de la contribución de los estrógenos en estas diferencias entre sexos, así como de los efectos de estas hormonas sobre la lipotoxicidad del miocardio, un desorden metabólico caracterizado, entre otras alteraciones, por la pérdida de la homeostasis mitocondrial. Para la consecución de estos objetivos se han combinado estudios *in vivo* con ratas Wistar de ambos sexos sometidas a diferentes manipulaciones hormonales, dietéticas y farmacológicas, y estudios *in vitro* en cardiomiocitos H9c2 para confirmar los efectos específicos de los diferentes tratamientos.

La ovariectomía produce una disminución de la capacidad oxidativa mitocondrial y un incremento del estrés oxidativo en el miocardio, efectos que son neutralizados en gran medida mediante la administración de 17β -estradiol (E_2). Los experimentos *in vitro* demuestran que estos efectos del E_2 estimulando la biogénesis mitocondrial se dan a través de su unión al receptor GPER, lo cual refuerza la relevancia de este receptor estrogénico como diana terapéutica para afrontar el incremento del riesgo de patología cardíaca en la peri- y la post-menopausia.

En ratas alimentadas con una dieta hiperlipídica se observa una mayor resistencia al desarrollo de lipotoxicidad cardíaca en las hembras, lo cual podría deberse a los efectos del E₂ reduciendo la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo que caracterizan este proceso lipotóxico. Además, las hembras muestran una mayor sensibilidad al tratamiento con rosiglitazona, un fármaco que atenúa los efectos lesivos de la lipotoxicidad. Esta mejor respuesta metabólica de las ratas hembra está asociada a una mayor activación de la proteína AMPK en el corazón en comparación con los machos, y nuestros resultados *in vitro* demuestran una contribución muy importante del E₂ en estas diferencias. Además, esta hormona reduce la activación de vías inflamatorias inducida por la lipotoxicidad en los cardiomiocitos, aunque en este caso de forma no dependiente de la AMPK. La importancia de esta proteína como elemento antiinflamatorio se ha visto también en células endoteliales, donde hemos descrito un nuevo mecanismo antiinflamatorio de la AMPK que implicaría una disminución de la activación de la TAK1, una proteína que activa simultáneamente las vías del NF- κ B y de las MAPKs p38 y JNK.

En conjunto, los resultados de esta tesis ponen de manifiesto que los estrógenos son importantes estimuladores de la función y la biogénesis mitocondriales cardíacas y reducen el estrés oxidativo y el estado inflamatorio de este órgano. Estos efectos de los estrógenos serían especialmente importantes en situaciones patológicas que conlleven alteraciones del metabolismo energético de los cardiomiocitos, como la lipotoxicidad cardíaca, y, por lo tanto, podrían ser un elemento clave en el desarrollo de estrategias terapéuticas para tratar estos desórdenes.



Universitat
de les Illes Balears

Effects of estrogens in cardiac mitochondrial biogenesis and function. Influence of lipotoxic environment

Doctoral thesis, Miquel Sbert Roig, Energy Metabolism and Nutrition Group, Department of Fundamental Biology and Health Sciences

ABSTRACT

Previous studies performed in our research group have reported the existence of a sexual dimorphism in mitochondrial biogenesis and function and oxidative stress in the heart such that female rats exhibit more differentiated mitochondria and a lower production of free radicals. In the light of this background, the aims of this doctoral thesis were to study the contribution of estrogens to these sex differences as well as the effects of these hormones on cardiac lipotoxicity, a metabolic disorder characterized by, among other alterations, loss of mitochondrial homeostasis. In order to achieve these purposes, we combined *in vivo* studies with Wistar rats subjected to different hormonal, dietary and pharmacological manipulations, and *in vitro* studies with H9c2 cardiomyocytes to confirm the specific effects of the different treatments.

Ovariectomy decreases mitochondrial oxidative capacity and increases oxidative stress in the myocardium, effects which are neutralized to a great extent by the administration of 17β -estradiol (E_2). The *in vitro* experiments performed in H9c2 cardiomyocytes demonstrate that the effects of E_2 in stimulating mitochondrial biogenesis occur through binding to GPER, which emphasizes the importance of this estrogen receptor as a therapeutic target to tackle the increase of cardiac disease in peri- and post-menopause.

In high-fat diet fed rats we observe a greater resistance to the development of cardiac lipotoxicity in females, which could be due to the effects of E_2 in ameliorating the mitochondrial dysfunction and oxidative stress that

characterize this lipotoxic process. In addition, females show a greater sensitivity to the treatment of rosiglitazone, a drug that reduces the detrimental effects of lipotoxicity. This better metabolic response of female rats is associated with greater cardiac AMPK activation compared to their male counterparts, and our *in vitro* results demonstrate an important contribution of E₂ to these differences. Moreover, this hormone also attenuates the activation of the inflammatory pathways induced by lipotoxicity in cardiomyocytes but, in this case, in an AMPK-independent way. The importance of this protein as an anti-inflammatory factor was also observed in endothelial cells, where we describe a new anti-inflammatory mechanism for AMPK that would imply a decrease in TAK1 activation, a protein that simultaneously activates NF- κ B pathway and both p38 and JNK MAPKs.

On the whole, the results of the present PhD thesis show that estrogens are important enhancers of cardiac mitochondrial biogenesis and function and reduce oxidative stress and inflammatory status in this organ. These effects would be particularly important in pathological situations that entail alterations in the energy metabolism of cardiomyocytes, such as cardiac lipotoxicity, and, consequently, could be a key element in the development of therapeutic strategies to deal with these disorders.

PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESI DOCTORAL

Part dels resultats d'aquesta tesi doctoral han estat recopilats en la següent publicació:

- Sbert-Roig M, Bauzá-Thorbrügge M, Galmés-Pascual BM, Capllonch-Amer G, García-Palmer FJ, Lladó I, Proenza AM, Gianotti M. *GPER mediates the effects of 17 β -estradiol in cardiac mitochondrial biogenesis and function*. Molecular and Cellular Endocrinology, 2016, 420: 116-24, DOI: 10.1016/j.mce.2015

A més, durant la realització de la present tesi, el doctorant ha col·laborat en altres estudis que es presenten a l'annex i que han donat lloc al següent article:

- Capllonch-Amer G, Sbert-Roig M, Galmés-Pascual BM, Proenza AM, Lladó I, Gianotti M, García-Palmer FJ. *Estradiol stimulates mitochondrial biogenesis and adiponectin synthesis in skeletal muscle*. Journal of Endocrinology, 2014, 221 (3): 391-403. DOI: 10.1530/JOE-14-0008

1. INTRODUCCIÓ

1.1. Metabolisme energètic cardíac

El cor és un òrgan musculós localitzat a l'interior de la caixa toràcica dels vertebrats la funció del qual és el bombeig de la sang a través dels vasos sanguinis. El consum energètic del cor és el més alt de l'organisme i s'estima que la massa mitocondrial suposa un terç de la massa cardíaca (Rowe et al., 2010). El cor genera contínuament alts nivells d'ATP necessaris per a la contracció cardíaca, per als processos metabòlics basals i pel manteniment de l'homeòstasi iònica. Aquest fet, juntament amb la seva baixa capacitat de reserva energètica, requereix que el cor obtingui els substrats energètics a partir de la circulació i que tingui flexibilitat metabòlica per adaptar-se als canvis en la biodisponibilitat d'aquests substrats (Lopaschuk et al., 2010).

1.1.1. Metabolisme lipídic cardíac

El cor adult obté normalment un 50-70% de l'ATP a partir de la β -oxidació d'àcids grassos (Lopaschuk et al., 2010; Fillmore et al., 2014). Encara que el cor té una certa capacitat d'emmagatzemar triglicèrids (TG), la principal font de lípids són els àcids grassos circulants, els quals poden estar units a albúmina o esterificats formant part de les VLDLs i els quilomicrons (Coort et al., 2007). Encara que el transport dels àcids grassos a través del plasmalemma pot ser per difusió passiva, els cardiomiòcits capten la major part dels àcids grassos a través de proteïnes transportadores (Taha and Lopaschuk, 2007). La principal d'aquestes proteïnes és el clúster de diferenciació (CD36), responsable aproximadament del 70% de la captació cardíaca d'àcids grassos (Coort et al., 2007) (fig. 1). El CD36 es troba en vesícules intracel·lulars i pot ser reclutat al plasmalemma per acció de la cinasa activada per AMP (AMPK) i per la insulina, així com també per alguns agents farmacològics (Coort et al., 2007; Bayeva et al., 2013). Altres proteïnes implicades en el transport d'àcids grassos a través del plasmalemma cardíac són la translocasa d'àcid grassos

(FAT) i la proteïna d'unió a àcids grassos del plasmalemma (FABP_{pm}) (Coort et al., 2007; Taha and Lopaschuk, 2007).

Un cop dins els cardiomiòcits, la major part dels àcids grassos són transferits als mitocondris per a ser oxidats i obtenir ATP. Els àcids grassos de cadena llarga no poden entrar directament als mitocondris i han de ser esterificats per la sintetasa d'acils-CoA (Coort et al., 2007; Bayeva et al., 2013). Els acils-CoA de cadena llarga resultants són transportats a la matriu mitocondrial a través del sistema de la transferasa de palmitoilcarnitina (CPT). Part dels àcids grassos captats no són oxidats, sinó que passen a formar part dels fosfolípids de membrana o emmagatzemats en forma de TG a vesícules lipídiques on poden ser emprats de manera ràpida en funció de la demanda energètica (Coort et al., 2007; Bayeva et al., 2013).

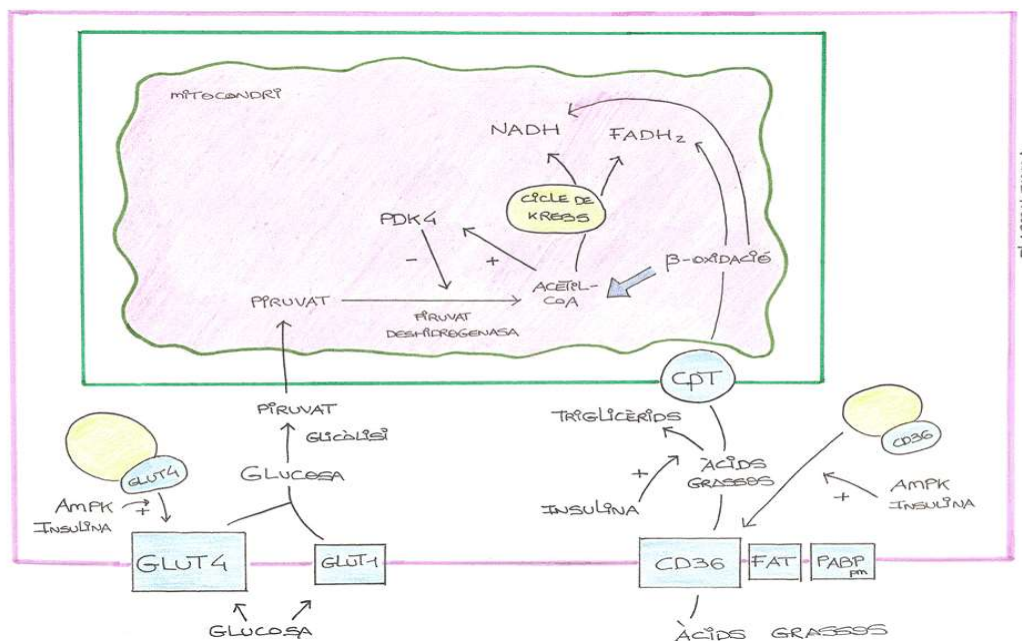


Figura 1. Metabolisme lipídic i glucídic cardíac. Els principals substrats energètics dels cardiomiòcits són els àcids grassos i la glucosa. El CD36 és el principal transportador d'àcids grassos els quals, un cop internalitzats, són transferits al mitocondri gràcies al sistema de la CPT, per a ser oxidats i originar acetil-CoA, NADH i FADH₂. Els cardiomiòcits capten la glucosa principalment a través del GLUT4 i, per vies glicolítiques, és convertida a piruvata, el qual és descarboxilat a acetil-CoA pel complex de la piruvata deshidrogenasa. L'acetil-CoA resultant de l'oxidació glucídica i lipídica entra al cicle de Krebs i s'obté NADH i FADH₂. AMPK, cinasa activada per AMP; CD36, clúster de diferenciació 36; CPT, transferasa de palmitoilcarnitina; FABP_{pm}, proteïna d'unió a àcids grassos del plasmalemma; FAT, translocasa d'àcids grassos; GLUT1, GLUT4, transportadors de glucosa de tipus 1 i 4; PDK4, cinasa 4 del complex de la piruvata deshidrogenasa. Adaptat de Coort et al. 2007

Un dels principals reguladors de l'oxidació d'àcids grassos és el malonil-CoA, que es forma a partir de la carboxilació de l'acetil-CoA catalitzada per l'acetil-CoA carboxilasa (ACC). El malonil-CoA és un inhibidor de la CPT1, de manera que un increment dels seus nivells suposa que els acils-CoA no siguin transportats al mitocondri. En situació de demanda energètica s'activa l'AMPK, la qual fosforila i inhibeix a l'ACC, de forma que, a més d'incrementar la captació d'àcids grassos, l'AMPK activa també el seu transport mitocondrial (Coort et al., 2007; Lopaschuk et al., 2010).

1.1.2. Metabolisme glucídic cardíac

Al cor adult, sols un 10-40% de l'acetil-CoA que arriba al cicle de Krebs prové de l'oxidació de glúcids (Taha and Lopaschuk, 2007). No obstant això, degut a l'elevat consum energètic del miocardi, el catabolisme glucídic cardíac és un dels més importants de l'organisme (Gray and Kim, 2011). Encara que el cor té petites quantitats de glicogen, la major part de la glucosa que emprà és captada de la circulació principalment a través del transportador de glucosa tipus 4 (GLUT4) i, en menor mesura, pel de tipus 1 (GLUT1) (fig. 1) (Taha and Lopaschuk, 2007; Montessuit and Lerch, 2013).

L'ús de glucosa al cor està regulat a nivell de la seva captació i del seu metabolisme. Així, la translocació de les vesícules que contenen GLUT4 cap al plasmalemma està estimulada per la insulina mitjançant l'activació de la via de la cinasa del 3-fosfatidilinositol (PI3K) i de la proteïna cinasa B (Akt) (Gray and Kim, 2011; Montessuit and Lerch, 2013). L'AMPK també activa la translocació del GLUT4 cap a la membrana cel·lular, però ho fa per mecanismes diferents als de la insulina ja que són independents de l'activació de PI3K/Akt (Montessuit and Lerch, 2013).

La regulació del metabolisme glucídic també es dona a nivell de la piruvat deshidrogenasa, un complex enzimàtic que origina acetil-CoA a partir del piruvat provinent de la glicòlisi. Quan el metabolisme lipídic és elevat es

generen grans quantitats d'acetil-CoA a través de la β -oxidació i aquest activa les cinases de la piruvat deshidrogenasa (PDK), especialment la PDK4, la qual fosforila i inhibeix la piruvat deshidrogenasa (Sugden and Holness, 2006). D'aquesta manera, l'oxidació de lípids té un efecte inhibitori sobre l'ús de glucosa com a font d'energia. Cal destacar que l'ús de glucosa també pot tenir un efecte inhibitori sobre l'oxidació lipídica. Així, la insulina activa la captació cardíaca de lípids però aquests no són oxidats sinó esterificats, alhora que s'estimula l'ús de glucosa (Palomer et al., 2013). Aquesta interrelació entre l'ús de glucosa i de lípids es coneix com a cicle de Randle (Randle et al., 1963).

1.1.3. Funció i biogènesi mitocondrials

Els mitocondris són orgànuls de doble membrana presents a les cèl·lules eucariotes la principal funció dels quals és produir energia en forma d'ATP, tot i que també són la principal font intracel·lular de les espècies reactives de l'oxigen (ROS) (Murphy, 2009). Altres funcions dels mitocondris són l'homeòstasi del calci, la biosíntesi del grup hemo i dels esteroides, i la regulació de la proliferació cel·lular i l'apoptosi (McBride et al., 2006).

El procés d'obtenció d'energia té lloc gràcies a l'entrada al cicle de Krebs de molècules provinents de l'oxidació dels glúcids o dels lípids, de manera que es genera poder reductor en forma de NADH i FADH₂. Aquestes molècules cedeixen els electrons als complexos de la cadena respiratòria i, a mesura que aquests són transportats entre els diferents centres redox d'aquesta cadena, s'origina un gradient protònic l'energia del qual és emprada per la ATP sintetasa per a produir ATP a partir d'ADP.

Els mitocondris posseeixen el seu propi material genètic, localitzat a la matriu mitocondrial i format per entre dues i deu molècules de DNA mitocondrial (mtDNA) (Fernández-Silva et al., 2003). El genoma mitocondrial de mamífers és una molècula bicatenària circular d'aproximadament 16.6 kb i no té proteïnes associades. Les dues cadenes difereixen en la seva composició de

G+T, de manera que es distingeix una cadena pesada i una lleugera en funció de la seva densitat quan són centrifugades en gradients de clorur de cesi. El mtDNA segueix un model d'organització molt econòmic ja que no posseeix introns, les seqüències intergèniques són curtes o absents i molts gens es superposen. A més, presenta un codi genètic diferent de l'universal (Taanman, 1999).

Gairebé la major part del DNA no codificant es localitza a una regió de triple cadena anomenada *D-loop* (fig. 2), la qual suposa el major *loci* de control de la replicació i la transcripció del mtDNA ja que s'hi localitzen els promotors de les dues hebres i l'origen de replicació de la cadena pesada (O_H). L'origen de replicació de la cadena lleugera (O_L) es localitza en una altra regió no codificant del genoma mitocondrial (Holt and Reyes, 2012).

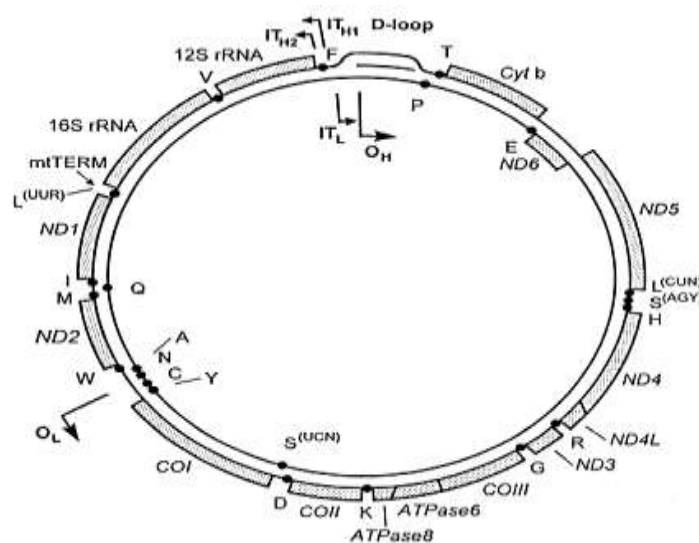


Figura 2. Mapa del DNA mitocondrial humà. Els cercles extern i intern representen la cadena pesada i la lleugera respectivament. La *D-loop* es troba en forma de triple hèlix i conté l' O_H . L' O_L es troba en una altra regió no codificant del mtDNA. A la figura s'indiquen també els gens codificats pels genoma mitocondrial –veure el text per més detalls-. O_H , origen de replicació de la cadena pesada; O_L , origen de replicació de la cadena lleugera. Extret de Taanman et al. 1999.

El mtDNA conté trenta-set gens, tretze dels quals codifiquen per proteïnes de la cadena respiratòria. Concretament, són set subunitats de la NADH:

ubiquinona oxidoreductasa (complex I, ND1-6, ND4L), una subunitat d'ubiquinona: citocrom *c* oxidoreductasa (complex III; citocrom b), tres subunitats de la citocrom *c* oxidasa (complex IV; COX I-III), i les subunitats 6 i 8 de l'ATP sintasa. Els vint-i-quatre gens restants codifiquen per dos RNA ribosòmics (12S i 16S) i vint-i-dos RNA de transferència. La resta de proteïnes mitocondrials estan codificades al genoma nuclear (Taanman, 1999).

El correcte manteniment de l'estructura i la funció mitocondrials depèn de la biogènesi mitocondrial, un procés que implica la proliferació i la diferenciació d'aquests orgànuls (Fernández-Silva et al., 2003). La proliferació consisteix en l'augment del nombre de mitocondris per cèl·lula, mentre que la diferenciació és l'adquisició de característiques estructurals i funcionals adequades pel desenvolupament de les funcions específiques dels mitocondris a les distintes cèl·lules de l'organisme. La biogènesi mitocondrial és un procés cel·lular complex, altament controlat, que implica l'expressió de més de mil gens i el canvi d'aproximadament el 20% de la proteïna cel·lular (López-Lluch et al., 2008).

El nombre i l'estructura dels mitocondris no és estàtic. Per exemple, durant l'etapa fetal el miocardi genera la major part de l'ATP a través de la glicòlisi i l'oxidació del lactat, per la qual cosa els mitocondris es troben poc desenvolupats. Després del naixement, els àcids grassos passen a ser el substrat energètic principal, de manera que es produeix un increment del nombre i grandària dels mitocondris i un desenvolupament de la cadena respiratòria mitocondrial (Marin-Garcia et al., 2000). De la mateixa manera, alteracions en la massa i funció mitocondrials estan associades a varis tipus de cardiomiopaties (Taha and Lopaschuk, 2007; Fillmore et al., 2014).

La biogènesi mitocondrial requereix d'una coordinació precisa entre el genoma mitocondrial i el nuclear la qual s'aconsegueix mitjançant una sèrie de

proteïnes reguladores codificades al nucli que coordinen l'expressió gènica de proteïnes mitocondrials als dos genomes.

1.1.3.1. Transcripció i replicació del genoma mitocondrial

La transcripció del genoma mitocondrial té lloc de manera bidireccional a partir dels promotors de la cadena lleugera i pesada, produint-se dos transcrits policistrònics que donen lloc als 13 RNAm, 22 RNAt i 2 rRNA codificats en aquest genoma. En aquest procés és clau la participació del factor de transcripció mitocondrial A (TFAM), el qual s'uneix als dos promotors i interactua amb els factors de transcripció mitocondrials B1 i B2 (TFB1M i TFB2M), de manera que es recluta la RNA polimerasa mitocondrial (POLMRT) i s'inicia la transcripció del mtDNA.

La replicació del mtDNA té lloc, principalment, durant el final de la fase S i a la fase G₂ del cicle cel·lular, encara que pot esdevenir en qualsevol moment del cicle (Bogenhagen and Clayton, 1977). El model més acceptat es basa en un procés de duplicació asincrònic del mtDNA que s'inicia a l'origen de replicació O_H donant lloc a una nova cadena pesada. Quan la maquinària de replicació arriba a l'O_L s'inicia la síntesi de la nova cadena lleugera (Holt and Reyes, 2012).

La transcripció i la replicació del genoma mitocondrial són dos processos coordinats. Quan hi ha baixos nivells de TFAM, la POLMRT finalitza de manera prematura la transcripció, donant lloc a un oligoribonucleòtid que actua com un encebador necessari per a la replicació del mtDNA. En canvi, quan els nivells de TFAM són elevats, aquest es pot unir al promotor de la cadena pesada i s'indueix la transcripció del mtDNA. Per tant, la regulació de la transcripció i replicació del mtDNA depèn dels nivells de TFAM (Fernández-Silva et al., 2003; Campbell et al., 2012).

1.1.3.2. Transcripció de gens nuclears per a proteïnes mitocondrials

La majoria de les proteïnes mitocondrials estan codificades al genoma nuclear. Entre aquestes cal destacar la majoria de les subunitats dels complexos de la cadena respiratòria, els enzims del cicle de Krebs i de la β -oxidació d'àcids grassos, les proteïnes desacoblants i els factors implicats en la replicació i expressió del genoma mitocondrial (Scarpulla et al., 2012).

Factors nuclears de respiració (NRFs)

El primer factor de transcripció nuclear implicat en l'expressió de proteïnes mitocondrials que es va descobrir fou el NRF1. Aquesta proteïna regula l'expressió de gens nuclears que codifiquen per a proteïnes dels cinc complexos mitocondrials i per a proteïnes implicades en l'assemblatge dels complexos ribosomals. A més, el NRF1 regula l'expressió dels gens que codifiquen pel TFAM, el TFB1M, el TFB2M i la POLMRT (Scarpulla et al., 2012; Vega et al., 2015). Per tant, NRF1 participa en la coordinació entre el genoma nuclear i el mitocondrial.

La proteïna NRF2 modula l'expressió nuclear de subunitats del complex IV de la cadena respiratòria mitocondrial i de proteïnes per a la maquinària d'importació proteica al mitocondri. També s'han vist llocs d'unió pel NRF2 a altres gens que codifiquen per a subunitats d'altres complexos de la cadena respiratòria, així com pel TFAM, el TFB1M i el TFB2M. En molts casos, els promotors que contenen llocs d'unió pel NRF2 també en contenen pel NRF1, encara que no és un fet general. Per exemple, als rosegadors el promotor del gen del TFAM no té element d'unió al NRF1, mentre que el gen del TFAM humà conté llocs d'unió al NRF1 i al NRF2 (Scarpulla, 2008).

Receptors activats per proliferadors peroxisomals (PPARs)

Els PPARs són membres de la superfamília dels receptors nuclears i regulen l'expressió de gens implicats en el metabolisme lipídic. Els principals lligants

naturals dels PPARs són els àcids grassos i derivats (Poulsen et al., 2012; Fan and Evans, 2015). Els PPARs s'uneixen als promotors dels gens diana en forma d'heterodímer amb un altre receptor nuclear, el receptor de retinoid X (RXR) (Poulsen et al., 2012; Fan and Evans, 2015).

Als mamífers hi ha tres isoformes, el PPAR α , el PPAR β/δ i el PPAR γ . El PPAR α fou el primer PPAR en identificar-se i s'expressa predominantment al fetge, al cor, al múscul esquelètic i al teixit adipós marró, i participa en la regulació de l'expressió de gens pel transport i l'oxidació d'àcids grassos (Poulsen et al., 2012; Fan and Evans, 2015). El PPAR β/δ té funcions molt similars al PPAR α i la seva expressió és més ubiqua, amb elevats nivells al cor, múscul esquelètic oxidatiu i tracte digestiu (Fan and Evans, 2015). El PPAR γ s'expressa principalment al teixit adipós blanc i marró, on és el principal regulador de l'adipogènesi; no obstant, no sembla tenir un paper en l'oxidació d'àcids grassos (Fan and Evans, 2015).

El cor adult obté la major part de l'ATP a partir de l'oxidació d'àcids grassos, de manera que el PPAR α és un important regulador del metabolisme cardíac. No obstant, només activa l'expressió de gens per a la captació i β -oxidació d'àcids grassos i no pel cicle de Krebs o la cadena respiratòria (Finck et al., 2002). Quan es sobreexpressa PPAR α al miocardi s'obté un fenotip similar al del cor lipotòxic ja que s'incrementa l'oxidació de lípids i disminueix l'ús de glucosa (Finck et al., 2002). El PPAR β/δ també regula l'oxidació cardíaca d'àcids grassos i la seva sobreexpressió incrementa l'expressió de gens pel catabolisme lipídic, però no comporta una menor oxidació de glucosa (Burkart et al., 2007). Per tant, sembla que al cor el PPAR α i el PPAR β/δ estan implicats en processos de regulació metabòlica diferents.

Receptors relacionats amb estrògens (ERRs)

Els ERRs, com els PPARs, són factors de transcripció de la superfamília dels receptors nuclears. Reben aquest nom degut a la seva similitud amb els

receptors d'estrògens, encara que no s'uneixen a aquestes hormones. S'ha vist que controlen l'expressió de gens nuclears que codifiquen per a proteïnes implicades en l'oxidació d'àcids grassos, el cicle de Krebs, la cadena respiratòria i la fosforilació oxidativa (Wang et al., 2015a). Existeixen tres isoformes (ERR α , ERR β i ERR γ). L'ERR α s'expressa de manera ubiqua i és molt abundant als teixits amb elevada despesa energètica, com el cor, el múscul esquelètic, el cervell i el teixit adipós marró. Tot i que l'ERR β i l'ERR γ també predominen a teixits amb un elevat metabolisme mitocondrial, els seus nivells són molt inferiors als de l'ERR α (Fan and Evans, 2015).

Al cor, la deleció de l'ERR α provoca una menor expressió de gens per a l'oxidació d'àcids grassos, però l'efecte és poc sever en condicions basals degut a una acció compensatòria de l'ERR γ . En canvi, en una situació de sobrecàrrega de pressió, on el cor necessita bombejar més volum sanguini, el miocardi és incapaç de fer front a aquesta forta demanda energètica i es dona disfunció cardíaca (Huss et al., 2007). De la mateixa manera, la deleció de l'ERR γ té efectes importants en el metabolisme lipídic cardíac que són compensats en part per l'ERR α (Alaynick et al., 2007).

Coactivadors del receptor activat per proliferadors peroxisomals γ (PGCs)

Els PGCs no tenen domini d'unió al DNA, de manera que exerceixen la seva funció com a coactivadors transcripcionals. Destaca el PGC-1 α , considerat el principal element regulador de la biogènesi mitocondrial ja que activa i integra les activitats dels diversos factors de transcripció implicats en l'expressió de les proteïnes mitocondrials (Scarpulla, 2008; Vega et al., 2015). Així, al múscul cardíac s'ha vist que el PGC-1 α s'uneix i activa a NRF1, NRF2, ERR α , ERR γ , PPAR α i PPAR β/δ (fig. 4) (Vega et al., 2015). D'aquesta manera, els ratolins *knock out* pel PGC-1 α presenten una menor capacitat contràctil cardíaca,

originant una disfunció cardíaca especialment en situacions d'elevada demanda energètica (Arany et al., 2005).

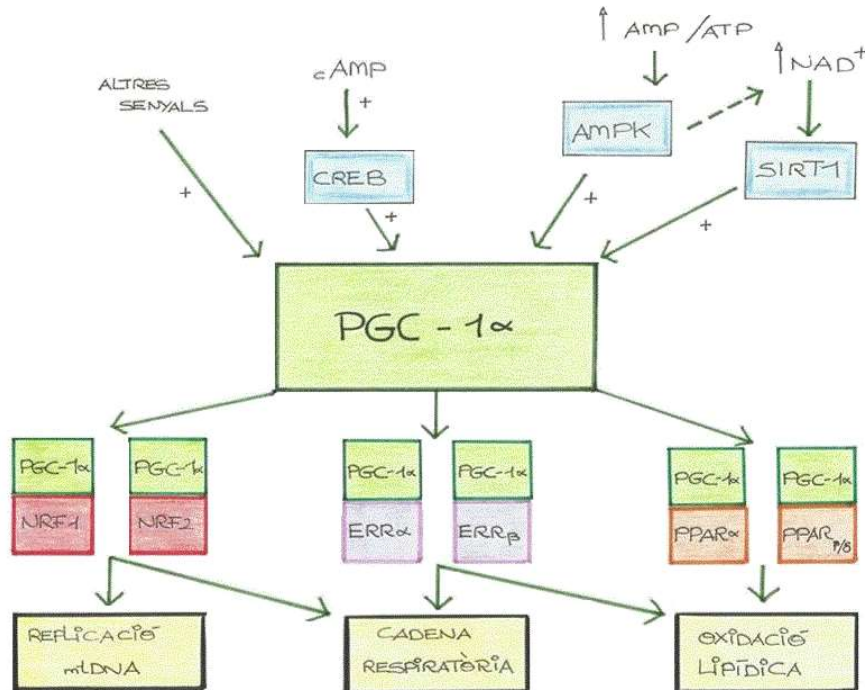


Figura 3. Regulació de la biogènesi mitocondrial a través del PGC-1 α . En resposta a una demanda energètica s'activen varies cascades de senyalització que activen el PGC-1 α . Aquest coactivador transcripcional interactua amb varis factors de transcripció implicats en l'expressió de gens mitocondrials, la qual cosa converteix al PGC-1 α al principal regulador i coordinador de la biogènesi mitocondrial. AMPK, cinasa activada per AMP; CREB, proteïna d'unió a l'element de resposta a cAMP; ERR α , ERR β , receptors relacionats amb estrògens α i β ; NRF1, NRF2, factors nuclears de respiració 1 i 2; PGC-1 α , coactivador 1 α del receptor activat per proliferadors peroxisomals γ ; PPAR α , PPAR β/δ , receptors activats per proliferadors peroxisomals α i β/δ ; SIRT1, sirtuïna 1. Adaptat de Vega et al., 2015.

D'entre els mecanismes reguladors del PGC-1 α destaca l'AMPK, la qual fosforila i activa al PGC-1 α . A més, l'AMPK, quan activa el metabolisme energètic, provoca un increment dels nivells de NAD⁺, de manera que s'activa la sirtuïna 1 (Sirt1), la qual desacetila i activa el PGC-1 α (Fernandez-Marcos and Auwerx, 2011; Vega et al., 2015). D'aquesta manera, s'estableix una connexió entre l'estatus energètic cel·lular, l'estat redox i la biogènesi mitocondrial.

Existeixen dues proteïnes homòlogues al PGC-1 α : el PGC-1 β i el coactivador tipus PGC-1 α (PRC). Sembla que al cor el PGC-1 α i el PGC-1 β podrien desenvolupar funcions redundants en situació basal ja que la pèrdua d'una d'aquestes proteïnes no provoca defectes en la funció mitocondrial, però quan la demanada energètica és superior fan falta les dues proteïnes pel correcte funcionament cardíac (Vega et al., 2015). El rol del PRC a la biogènesi mitocondrial cardíaca ha estat poc estudiat ja que, al contrari que el PGC-1 α i el PGC-1 β , s'expressa principalment a teixits amb menor abundància de mitocondris (Scarpulla, 2008).

1.1.3.3. Dinàmica mitocondrial

Els mitocondris no són orgànuls estàtics, sinó que contínuament es troben sotmesos a canvis en la seva localització i morfologia. El conjunt d'aquests processos és conegut com a dinàmica mitocondrial. La morfologia mitocondrial depèn dels processos de fusió i fissió d'aquests orgànuls. La fusió és la unió de dos o més mitocondris entre si i està controlat per les mitofusines 1 i 2 (Mfn1, Mfn2) i per la proteïna de l'atròfia òptica 1 (OPA1). Les Mfn es localitzen a la membrana mitocondrial externa i s'associen amb l'OPA1 de la membrana mitocondrial interna per a coordinar la correcta unió de les membranes dels diferents mitocondris. La fusió mitocondrial implica una homogeneïtzació de la xarxa mitocondrial de la cèl·lula la qual cosa pot suposar un mecanisme de control en front a possibles mutacions (Kuzmich et al., 2011). La fissió mitocondrial, en canvi, suposa una fragmentació d'un mitocondri en varis i està controlada per la proteïna de fissió 1 (Fis1) i pel receptor relacionat amb la dinamina 1 (Drp1). La Fis1 es localitza a la membrana mitocondrial externa i interacciona amb el Drp1, localitzat al citoplasma, de manera que s'activa la constricció de les membranes mitocondrials (Elgass et al., 2013). La fissió mitocondrial permet eliminar selectivament mitocondris vells o danyats per mitofàgia així com augmentar el nombre de mitocondris (Elgass et al., 2013).

Els cardiomiòcits adults són cèl·lules molt organitzades on el moviment de mitocondris es troba molt restringit. De fet, els mitocondris cardíacs es troben empaquetats entre les miofibril·les (mitocondris intermiofibrilars), sota la membrana plasmàtica (mitocondris subsarcolèmics) o vora la membrana nuclear (mitocondris perinuclears) (Piquereau et al., 2013), fet que suposa que els mitocondris no es trobin formant una xarxa contínua. A més, s'ha vist mitjançant tècniques microscòpiques que els mitocondris cardíacs de rates presenten pocs esdeveniments de fusió i fissió (Kuzmicic et al., 2011). No obstant, l'expressió de proteïnes implicades en la dinàmica mitocondrial és particularment elevada en aquest òrgan, la qual cosa suggereix que aquests orgànuls no es troben completament lliures d'experimentar esdeveniments de fusió i fissió (Ong and Hausenloy, 2010). De fet, diverses patologies cardíques estan associades amb alteracions en proteïnes implicades en la dinàmica mitocondrial. Per exemple, s'han observat menors nivells d'OPA1 a pacients amb fallida cardíaca, fet acompanyat per una població mitocondrial més fragmentada (Chen et al., 2009b). De la mateixa manera, una manca de la proteïna Drp1 al cor de ratolins provoca a una elongació dels mitocondris cardíacs que condueix a la seva disfunció (Ashrafian et al., 2010).

1.1.4. Els mitocondris com a font de radicals lliures d'oxigen (ROS)

Malgrat la seva importància en el metabolisme mitocondrial, l'oxigen provoca alhora que es formin ROS, unes espècies altament reactives que originen dany oxidatiu i comprometen la funció dels mitocondris i de les cèl·lules. Així, una petita proporció de l'oxigen consumit als mitocondris es converteix en ROS, de manera que aquests orgànuls suposen la principal font cel·lular de radicals lliures. Encara que els ROS contribueixen al dany mitocondrial característic de moltes patologies, també són importants en la senyalització redox des dels mitocondris cap a la resta de la cèl·lula (Murphy, 2009). És important destacar que els mitocondris no són la única font de ROS als cardiomiòcits. Així,

enzims com la NADPH oxidasa, la xantina oxidasa i les sintases d'òxid nítric també poden contribuir a la formació cel·lular de ROS (Selvaraju et al., 2012).

Als mitocondris es produeix anió superòxid (O_2^-) a partir de la reducció de l'oxigen per un electró provinent principalment de grups prostètics reduïts de la cadena de transport electrònic (ETC) (fig. 4) (Murphy, 2009). Quan la disponibilitat de substrats és elevada, el cicle de Krebs genera gran quantitat de NADH i $FADH_2$, de manera que l'ETC assoleix la seva capacitat màxima i augmenta la relació ATP/ADP (Selvaraju et al., 2012). Això fa que la membrana mitocondrial estigui hiperpolaritzada i, en conseqüència, l'ETC està parcialment bloquejada i s'acumulen electrons als complexos I i III, els quals poden reaccionar amb l'oxigen i produir O_2^- (Selvaraju et al., 2012). Un altre estat fisiològic que incrementa la producció de ROS és la hipòxia, que es produeix, per exemple, en una isquèmia cardíaca, ja que els intermediaris de l'ETC estan més reduïts (Santos et al., 2011).

Degut a la seva curta vida mitjana, el O_2^- difícilment pot travessar la membrana mitocondrial però, en canvi, pot originar peròxid d'hidrogen (H_2O_2) (fig. 4), que és més estable i es troba cent vegades més concentrat al mitocondri respecte el O_2^- . A més, el H_2O_2 pot travessar les membranes i difondre cap als diferents compartiments cel·lulars, de manera que pot propagar senyals cel·lulars provinents dels mitocondris (Aon et al., 2015). No obstant, malgrat l'estabilitat del H_2O_2 , en presència de metalls de transició, especialment ferro, pot donar lloc per reacció de Fenton a l'ió hidroxil (OH \cdot), el qual és altament tòxic (Bolisetty and Jaimes, 2013).

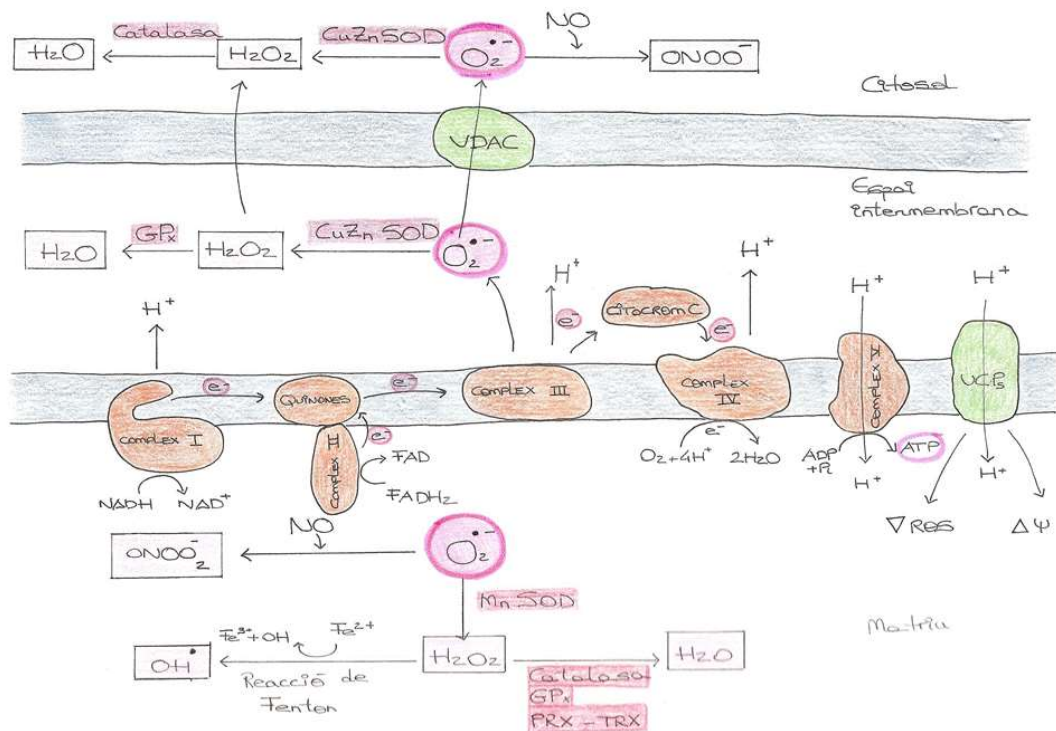


Figura 4. Producció mitocondrial de ROS i paper dels enzims antioxidants i de les UCPs. Part dels electrons que circulen per la cadena de transport electrònic mitocondrial escapen dels centres redox i redueixen l'oxigen a anió superòxid, una espècie altament reactiva i precursora d'altres ROS. Com a mecanisme de defensa antioxidant, els mitocondris han desenvolupat sistemes enzimàtics per neutralitzar els ROS, així com les proteïnes UCPs que, entre altres funcions, disminueixen la producció d'aquestes molècules. Cu/Zn-SOD, superòxid dismutasa de coure/zinc; GPx, glutatió peroxidasa; Mn-SOD, superòxid dismutasa de manganès; PRX, peroxiredoxina; ROS, espècies reactives de l'oxigen; TRX, tioredoxina; UCPs, proteïnes desacoblants; VDAC, canal aniónic dependent de voltatge. Adaptat de Murphy 2009.

L'elevada reactivitat dels ROS fa que aquests reaccionin amb els components cel·lulars comprometent la seva estructura i funció. Així, el $O_2^{\cdot-}$ pot reaccionar amb l'òxid nítric (NO) i donar lloc a peroxinitrit ($ONOO_2^-$), el qual pot provocar la formació de 8-hidro(deoxi)guanosina, provocant mutacions al mtDNA i comprometent l'estabilitat del RNA (Li et al., 2013; Bar-Or et al., 2015). Els ROS també poden reaccionar amb àcids grassos insaturats de cadena llarga de les membranes cel·lulars i generar productes de peroxidació lipídica com el malondialdehid o el 4-hidroxinonenal (4-HNE), els quals indueixen una pèrdua de funcionalitat de membrana. Els ROS actuen també sobre les proteïnes causant la seva disfunció i degradació (Bar-Or et al., 2015).

Degut a aquesta elevada toxicitat dels ROS, els mitocondris han desenvolupat sistemes antioxidants per a neutralitzar-los a mesura que es van generant (fig. 4). Així, el dany oxidatiu final depèn del balanç entre la producció de ROS i la seva eliminació. Aquests sistemes antioxidants poden ser enzimàtics o no enzimàtics. D'entre els primers destaquen la família de les superòxid dismutases (SOD), especialment la Mn SOD de la matriu mitocondrial, que catalitzen la dismutació del O_2^- a H_2O_2 . El H_2O_2 pot ser reduït a aigua a través d'enzims antioxidants, com ara la catalasa i la glutatió peroxidasa (GPx), i pel sistema peroxiredoxina-tioredoxina (Cox et al., 2010; Li et al., 2013). D'entre els antioxidants no enzimàtics destaquen molècules de baix pes molecular que poden actuar directament com *scavengers* dels ROS, com ara l'àcid ascòrbic o el glutatió.

Les cèl·lules també han desenvolupat estratègies per disminuir la producció de ROS, entre les quals cal destacar les proteïnes desacoblants (UCPs). Les UCPs es localitzen a la membrana mitocondrial interna i transporten protons de l'espai intermembrana cap a la matriu mitocondrial, dissipant el gradient protònic originat per la cadena respiratòria (fig. 4). Aquest retorn de protons no s'acobla a una síntesi d'ATP sinó que l'energia del gradient protònic es dissipa en forma de calor. El múscul cardíac expressa UCP2 i UCP3, especialment quan s'incrementa el metabolisme lipídic cardíac per acció del PPAR α (Nabben and Hoeks, 2008). En aquesta situació, el potencial de membrana mitocondrial és elevat i es produeixen ROS, els quals s'ha suggerit que poden activar aquestes UCPs i produir un lleu desacoblament, de manera que, per un mecanisme de retroalimentació negativa, prevenen la formació de ROS i disminueixen el dany oxidatiu (Busiello et al., 2015). També s'ha proposat que les UCP2 i UCP3 actuarien com a transportadors d'anions d'àcid gras cap a l'espai intermembrana, evitant l'acumulació d'aquests a la matriu on poden desencadenar cascades de dany oxidatiu (Busiello et al., 2015).

1.1.5. Diferències entre sexes en la funció i la biogènesi mitocondrials: paper dels estrògens

A Espanya i a altres països europeus la mortalitat associada a patologies cardíaques, com és el cas de la cardiomiopatia isquèmica i l'infart de miocardi és, en general, major als homes que a les dones (Sociedad Española de Arteriosclerosis, 2007). No obstant això, l'avantatge femenina enfront les malalties cardiovasculars es perd després de la menopausa (Ostadal et al., 2009; Mikkola et al., 2013). Per aquest motiu, les hormones sexuals estan considerades les principals responsables d'aquestes diferències entre gèneres. A més de les hormones sexuals, alguns factors ambientals, com la major prevalença de tabaquisme i alcoholisme als homes, podrien contribuir també en aquest dimorfisme. Finalment, la diferent dotació cromosòmica entre sexes també és un factor a tenir en compte, però només afectaria a un grup concret de malalties (Meyer et al., 2014).

Estudis previs realitzats al nostre grup d'investigació mostren com les rates femella presenten una població mitocondrial cardíaca més diferenciada que la dels mascles, fet que va acompanyat d'una menor producció de ROS i un menor dany oxidatiu (Colom et al., 2007b). Degut a la importància del metabolisme energètic en el correcte funcionament del cor, les diferències entre sexes en el metabolisme cardíac podrien explicar aquesta diferent incidència en la patologia cardíaca entre homes i dones. A més, s'ha vist que els efectes de l'envelliment sobre la funció mitocondrial i l'estrès oxidatiu cardíacs són més marcats a les rates femella que als mascles, fet que podria estar relacionat amb la disminució dels nivells circulants d'estrògens associada a l'envelliment (Colom et al., 2014).

És important assenyalar que s'ha observat també com les rates femella presenten una major funció i biogènesi mitocondrials a altres teixits, com el teixit adipós blanc (Amengual-Cladera et al., 2012), el teixit adipós marró

(Nadal-Casellas et al., 2013), el fetge (Justo et al., 2005; Valle et al., 2007; Nadal-Casellas et al., 2010), el múscul esquelètic (Colom et al., 2007a; Gómez-Pérez et al., 2008) i el cervell (Guevara et al., 2009).

1.1.5.1. Els estrògens i els seus receptors

Els estrògens són hormones sexuals esteroides sintetitzades principalment als ovaris, encara que també poden ser produïts a l'escorça suprarenal, el teixit adipós i els testicles. El principal estrogen present en la circulació durant l'edat reproductora femenina és el 17β -estradiol (E_2), el qual és sintetitzat a partir de la testosterona, a través de l'enzim aromatasas, o de l'estrone, mitjançant la 17 -cetoreductasa. Altres estrògens presents en la circulació són l'estrone, l'estrogen més abundant a les dones postmenopàusiques, i l'estriol, el qual podria ser important durant l'embaràs. Tot i que el rol fisiològic més rellevant dels estrògens és el desenvolupament dels òrgans reproductors, també s'ha vist que influeixen en processos patològics no relacionats amb la reproducció, com ara l'osteoporosi, el càncer, l'obesitat i les malalties cardiovasculars (Deroo and Korach, 2006).

La naturalesa lipòfila dels estrògens fa que difonguin a través de la membrana plasmàtica de les cèl·lules dels teixits diana i puguin unir-se a receptors específics. Els dos receptors més estudiats són els receptors d'estrogen α i β ($ER\alpha$ i $ER\beta$), els quals formen part de la superfamília dels receptors nuclears. La interacció de l' E_2 amb aquests receptors provoca la dimerització i translocació d'aquests cap al nucli (fig. 5), on actuen com a factors de transcripció de gens que al seu promotor presenten elements de resposta a estrògens (EREs) (Björnström and Sjöberg, 2005). Els ERs també poden actuar a través d'altres factors de transcripció i regular l'expressió de gens que no contenen EREs. Per exemple, poden unir-se al NF- κ B i inhibir la transcripció del gen de la IL-6 (Ray et al., 1994). A més, l' $ER\alpha$ i l' $ER\beta$ poden activar mecanismes no genòmics, com ara l'activació de cascades de cinases

que activen a la sintasa d'òxid nítric endotelial (eNOS) (Björnström and Sjöberg, 2005). L'ER α i l'ER β tenen una distribució tissular específica que pot variar entre espècies (Foryst-Ludwig and Kintscher, 2010). A més, encara que els efectes mediat per ambdós receptors són compartits degut a la seva elevada homologia, s'han descrit diferències entre els efectes mediat per l'ER α i per l'ER β . Per exemple, els cardiomiòcits expressen ambdós ERs, però s'ha vist un rol cardioprotector de l'ER α en el dany per isquèmia i reperfusió, però no per part de l'ER β (Knowlton and Korzick, 2014).

Existeix també el receptor d'estrògens associat a proteïnes G (GPER), una proteïna integral de membrana localitzada principalment al reticle endoplasmàtic i a la membrana cel·lular (Prossnitz and Barton, 2014). S'expressa a les cèl·lules del sistema cardiovascular, incloent cardiomiòcits, cèl·lules endotelials i cèl·lules musculars llises, i també a altres teixits com el teixit adipós, el fetge i el pàncrees (Nilsson et al., 2011). A diferència dels ERs, el GPER no és un factor de transcripció, sinó que actua mitjançant proteïnes G associades, de manera que s'han descrit principalment mecanismes no genòmics mediat per aquest receptor, com ara l'activació de la via del cAMP-PKA, l'activació de la PKC i la modulació de canals iònics (Prossnitz and Barton, 2014). No obstant això, també s'han descrit alguns efectes genòmics mediat pel GPER, com ara la inhibició de l'expressió cardíaca del factor α induïble per hipòxia i del factor de creixement del teixit connectiu (De Francesco et al., 2013).

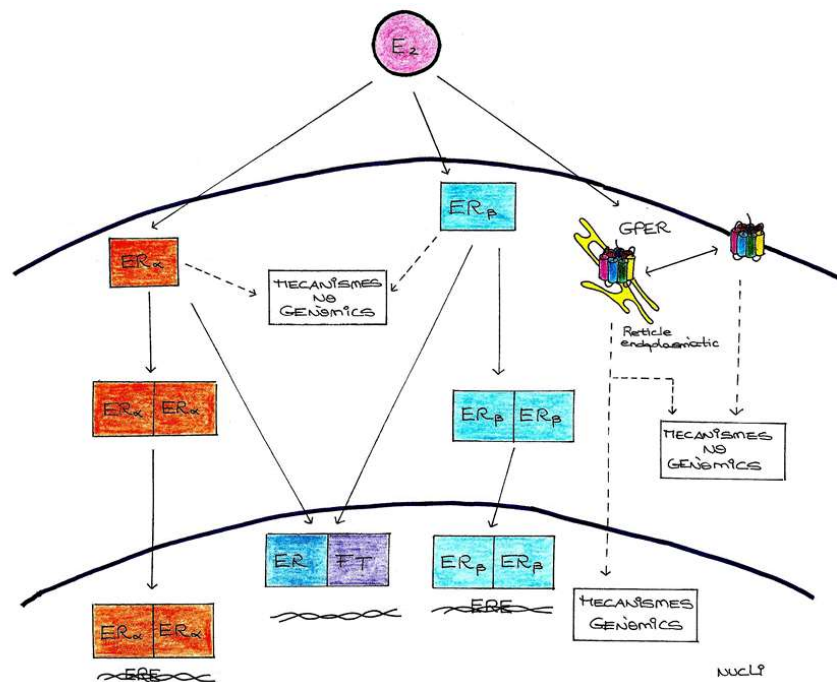


Figura 5. Efectes genòmics i no genòmics mediats pel 17β-estradiol. Les accions genòmiques de l'E₂ són produïdes a través de la seva unió als receptors ERα i ERβ, provocant que formin homodímers o heterodímers amb altres factors de transcripció, i regulant així l'expressió gènica. Es poden activar també altres mecanismes cel·lulars, com ara cascades de cinases. A més, l'E₂ pot unir-se a un tercer receptor associat a membrana, el GPER, i desencadenar respostes genòmiques i no genòmiques. E₂, 17β-estradiol; ERα, ERβ, receptors d'estrògens α i β; ERE, element de resposta a estrògens; FT, factor de transcripció; GPER, receptor d'estrògens associat a proteïnes G. Adaptat de Knowlton i Korzick 2014, i de Prossnitz i Barton 2014.

1.1.5.2. Efectes dels estrògens sobre el metabolisme energètic

S'ha proposat que les hormones sexuals podrien regular la biogènesi i la funció mitocondrials a varis teixits (Klinge, 2008; Chen et al., 2009a; Velarde, 2014). Estudis previs realitzats pel nostre grup d'investigació mostren com l'ovariectomia disminueix la funció i la biogènesi mitocondrials al múscul esquelètic de rata, mentre que la suplementació amb E₂ reverteix parcialment aquests efectes. Aquests resultats estan recolzats per un efecte potenciador de l'E₂ sobre la biogènesi i la funció mitocondrials a miòcits L6E9 (Capllonch-Amer et al., 2014b). De la mateixa manera, a adipòcits 3T3-L1 s'ha vist que l'E₂ estimula l'expressió de factors implicats en la biogènesi mitocondrial, com el PGC-1α, el PGC-1β i el TFAM (Capllonch-Amer et al., 2014a). A altres

teixits, com ara vasos sanguinis cerebrals, també s'han observat efectes similars dels estrògens (Stirone et al., 2005).

Els efectes dels estrògens estimulant la biogènesi i la funció mitocondrials van en paral·lel amb un efecte antioxidant. Per exemple, al múscul esquelètic els estrògens incrementen l'expressió i activitat d'enzims antioxidants (Baltgalvis et al., 2010; Capllonch-Amer et al., 2014b) i els nivells d'UCP3 (Capllonch-Amer et al., 2014b). D'altra banda, aquestes hormones poden neutralitzar directament els ROS a través de la seva estructura fenòlica ja que posseeixen una activitat antioxidant similar a altres compostos fenòlics, com ara la vitamina E (Mooradian, 1993).

1.2. Lipotoxicitat cardíaca

La lipotoxicitat és una alteració metabòlica tissular resultat de l'esteatosi o acumulació de lípids a teixits no adiposos, com ara els músculs cardíac i esquelètic i el fetge. Hi ha varis factors que poden afectar a l'inici i la progressió de la lipotoxicitat al miocardi, encara que sembla que el principal desencadenant seria una mala adaptació del metabolisme cardíac a una hiperlipèmia crònica (Sung et al., 2015). D'aquesta manera, situacions patològiques que comportin un increment dels lípids circulants, com ara el síndrome metabòlic, l'obesitat o les lipodistròfies, poden originar lipotoxicitat al miocardi (Peura and Schaffer, 2015).

1.2.1. La disfunció del teixit adipós com a causa de la lipotoxicitat cardíaca

El teixit adipós blanc té com a funció principal emmagatzemar l'excés d'energia en forma de TG. A més, també actua com un òrgan endocrí i secreta un gran nombre de proteïnes conegudes com adipoquines que poden tenir un efecte autocrí, paracrí o endocrí. La disfunció del teixit adipós, per tant, provoca un emmagatzematge incorrecte dels lípids i una alteració en la secreció d'adipoquines, originant així una alteració metabòlica a nivell sistèmic (Garg, 2006).

Una de les principals causes de la disfunció del teixit adipós és l'obesitat, una patologia crònica caracteritzada per un increment de les reserves lipídiques en aquest teixit. Encara que l'origen és multifactorial, la principal causa de l'obesitat és el desequilibri energètic: la ingesta calòrica és major que la despesa energètica de l'organisme (Sansbury and Hill, 2014). L'obesitat és una malaltia epidèmica als països desenvolupats i s'associa a comorbiditats com la resistència a la insulina (diabetis tipus 2), les malalties cardiovasculars o el càncer (Bray, 2004).

Cada vegada està més acceptat el model lipocèntric com a principal factor etiològic de l'obesitat (fig. 6). Segons aquest model, el teixit adipós supera la seva capacitat d'emmagatzemar lípids, de manera que aquests s'acumulen en teixits perifèrics com el fetge, el múscul esquelètic, el múscul cardíac, l'endoteli o el pàncrees, donant lloc a esteatosi i lipotoxicitat perifèriques i resistència a la insulina. Encara que el pàncrees respon inicialment amb un increment de la secreció d'insulina, finalment es produeix fallida de les cèl·lules β d'aquest òrgan i la conseqüent hiperglucèmia (Virtue and Vidal-Puig, 2010; McKenney and Short, 2011). A més, en condicions d'obesitat el teixit adipós modifica la seva capacitat endocrina ja que augmenta la secreció d'adipoquines proinflamàtores, com la interleucina 6 (IL-6), el factor de necrosi tumoral α (TNF- α) i la leptina, i disminueix la d'adipoquines cardioprotectores, com l'adiponectina (Van de Voorde et al., 2013).

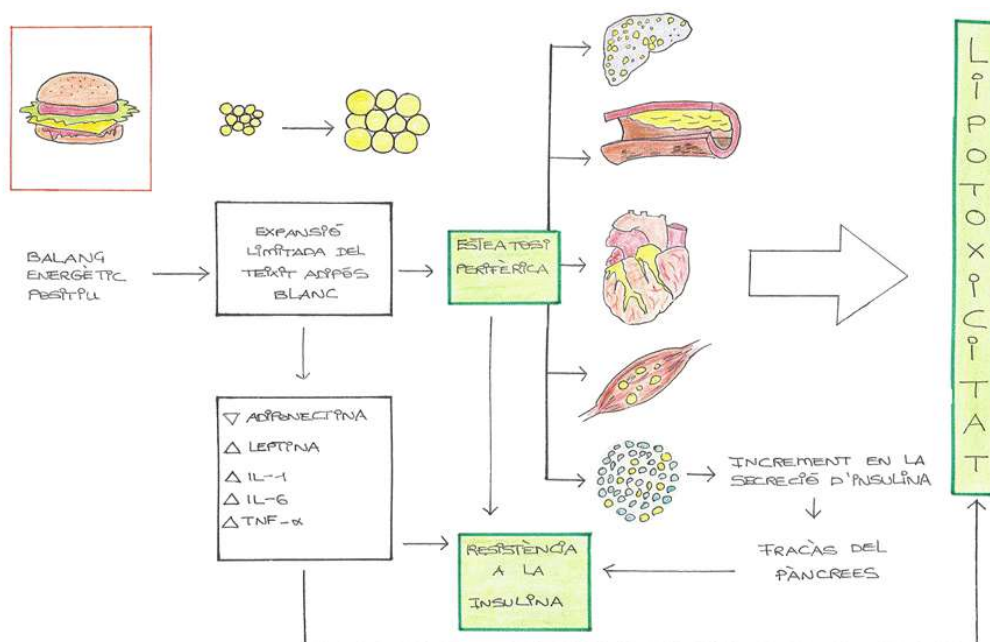


Figura 6. Model lipocèntric de desenvolupament de lipotoxicitat i resistència a la insulina. La capacitat d'expansió del teixit adipós és limitada i, en una situació de balanç energètic positiu, els greixos s'acumulen de manera ectòpica originant lipotoxicitat als òrgans perifèrics i resistència a la insulina. El canvi en el perfil de secreció d'adipoquines, a més, agreuja el procés lipotòxic. IL-1, IL-6, interleucines 1 i 6; TNF- α , factor de necrosi tumoral α . Adaptat de Virtue i Vidal-Puig, 2010.

Per tant, la disfunció del teixit adipós és un element clau que connecta l'obesitat i les malalties cardiovasculars, les quals són la principal causa de mort en la població obesa (Pappachan et al., 2013). De fet, l'obesitat és un factor de risc independent de la malaltia cardiovascular (Bastien et al., 2014). L'obesitat i la diabetis poden afectar al cor de tres formes principals (Pappachan et al., 2013):

- 1) malaltia arterial coronària
- 2) neuropatia cardíaca autonòmica
- 3) cardiomiopatia diabètica per lipotoxicitat cardíaca

La cardiomiopatia diabètica fou descrita per primera vegada per Rubler *et al.* el 1972 com una disfunció del miocardi a pacients diabètics en absència de neuropatia cardíaca autonòmica, hipertensió, malaltia coronària o malaltia valvular cardíaca (Rubler et al., 1972). Aquesta patologia es caracteritza per una esteatosi i una lipotoxicitat cardíaca, les quals provoquen una hipertròfia concèntrica del ventricle esquerre per increment de la gruixa de les parets d'aquest ventricle que condueix a la seva disfunció diastòlica (Mandavia et al., 2013).

1.2.2. Fallida metabòlica del cor lipotòxic

S'ha proposat dividir la patogènesi de la lipotoxicitat cardíaca en tres fases: compensada, de transició i descompensada (fig.7) (Schilling, 2015).

Fase compensada En aquesta primera etapa, el múscul cardíac rep elevades quantitats d'àcids grassos degut a l'elevada lipèmia, de manera que augmenta la captació i l'oxidació de lípids (Fillmore et al., 2014; Sung et al., 2015). Aquesta reprogramació metabòlica cardíaca s'esdevé a través de l'acció del PPAR α , el qual és activat per àcids grassos, i del PGC-1 α , de manera que també augmenta la biogènesi mitocondrial per afrontar l'elevada demanda

d'oxidació lipídica (Schilling, 2015; Sung et al., 2015). L'excés d'àcids grassos s'emmagatzema en forma de TG, minimitzant la producció d'espècies tòxiques de lípids i la lipotoxicitat. No obstant, l'elevat rati d'oxidació lipídica fa que el cor empri menys glucosa com a font d'acetil-CoA degut a l'acció inhibidora de la PDK4 sobre la piruvat deshidrogenasa (Sugden and Holness, 2006; Bayeva et al., 2013). En conseqüència, el cor passa de ser un òrgan omnívor a tenir inflexibilitat metabòlica. Aquest fenotip és especialment greu quan hi ha canvis en la disponibilitat de substrats com, per exemple, durant una isquèmia, situació en la qual la disponibilitat d'oxigen és baixa i s'obté ATP per vies glicolítiques (Schilling, 2015).

Fase de transició A mesura que es perllonga el flux d'àcids grassos cap als mitocondris cardíacs es produeix un desequilibri entre la β -oxidació i la respiració mitocondrial, originant un elevat potencial de membrana i un bloqueig de l'ETC que provoquen un increment en la formació de ROS (Schilling, 2015). A més, per obtenir la mateixa quantitat d'ATP, l'oxidació lipídica comporta l'ús de més oxigen en comparació amb l'oxidació de glucosa, la qual potencia encara més la producció de ROS (Bayeva et al., 2013).

El desequilibri entre la captació i l'oxidació lipídiques provoca un major increment dels TG cardíacs (Schilling, 2015). Encara que els TG *per se* no són tòxics, si que són precursors d'intermediaris lipídics tòxics, especialment ceramides i diacilglicerols (DAG). Aquestes molècules, juntament amb els ROS, activen cascades de cinases que provoquen la fosforilació del substrat 1 del receptor d'insulina (IRS1) en residus de serina, bloquejant la fosforilació de tirosines que transdueix la senyalització de la insulina, de manera que es produeix resistència cardíaca a aquesta hormona (Fillmore et al., 2014; Sung et al., 2015).

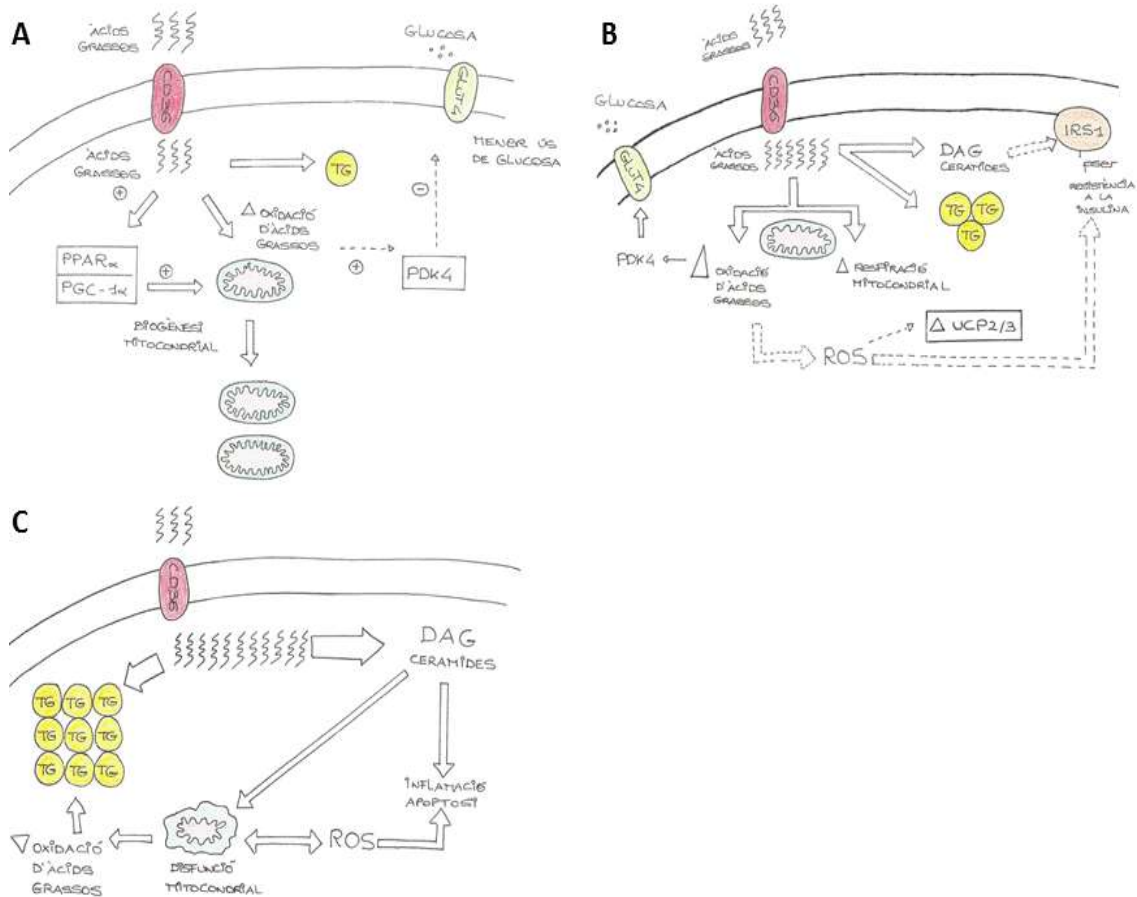


Figura 7. Fases de la patogènesi de la lipotoxicitat cardíaca. A) Fase compensada. L'elevada captació d'àcids grassos provoca l'increment de la biogènesi mitocondrial i de l'oxidació lipídica a través del PPAR α i del PGC-1 α , de manera que es redueix l'ús de glucosa com a substrat. **B) Fase de transició.** El desequilibri entre la β -oxidació i la respiració mitocondrial condueix a un increment del contingut de triglicèrids cardíacs, així com a la formació d'espècies lipídiques tòxiques i de ROS que provoquen resistència cardíaca a la insulina. D'entre els mecanismes de resposta dels cardiomiòcits a aquest ambient tòxic destaquen les UCPs les quals, a través del desacoblament, redueixen la producció mitocondrial de ROS. **C) Fase descompensada.** Els mecanismes de resposta són insuficients i s'incrementa la formació de ROS, provocant disfunció mitocondrial i l'activació de vies inflamatòries que agreugen la situació lipotòxica. CD36, clúster de diferenciació 36; DAG, diacilglicerol; GLUT4, transportador de glucosa de tipus 4; IRS1, substrat 1 del receptor de la insulina; PDK4, cinasa 4 del complex de la piruvat deshidrogenasa; PGC-1 α , coactivador 1 α del receptor activat per proliferadors peroxisomals γ ; PPAR α , receptor activat per proliferadors peroxisomals α ; ROS, espècies reactives de l'oxigen; TG, triglicèrids; UCP2, UCP3, proteïnes desacoblants 2 i 3. Adaptat de Schilling, 2015.

Fase descompensada A curt termini, els cardiomiòcits responen incrementant mecanismes antioxidants, com ara els enzims antioxidants i les UCPs (Schilling, 2015). No obstant, aquestes adaptacions no aconsegueixen

contrarestar els ROS, donant lloc a una major acumulació d'espècies lipídiques tòxiques i dany oxidatiu que desemboquen en una disfunció mitocondrial (Schilling, 2015). La disminució de la capacitat oxidativa incrementa el desequilibri entre la captació i l'oxidació d'àcids grassos, de manera que es sobrepassa la capacitat d'emmagatzemar TG dels cardiomiòcits i s'incrementa encara més la formació de ceramides i DAG, provocant un cercle viciós que agreuja la disfunció mitocondrial i la lipotoxicitat.

1.2.3. Inflamació al cor lipotòxic

A la fase descompensada d'una lipotoxicitat cardíaca, les ROS i les espècies lipídiques tòxiques condueixen a l'activació de vies inflamatòries. La inflamació, juntament amb la disfunció mitocondrial, provoca eventualment la mort dels cardiomiòcits i la infiltració de leucòcits (Schilling, 2015), a més del desenvolupament d'una hipertròfia patològica que pot desencadenar disfunció cardíaca (Palomer et al., 2013).

Entre les vies inflamatòries activades al cor lipotòxic destaquen les cinases activades per mitògens (MAPKs) i la via del factor nuclear κ B (NF- κ B). Les vies de les MAPKs són cascades organitzades en tres nivells de proteïnes cinases: les MAPKs, les quals són fosforilades per les MAPKKs que a la vegada són fosforilades per les MAPKKKs. Aquestes darreres són activades per elements *upstream* en resposta a varis estímuls. Les MAPKs més estudiades són la p38, les cinases 1 i 2 de l'extrem N-terminal de c-Jun (JNK 1/2, p46 i p54) i les cinases 1 i 2 regulades per senyals extracel·lulars (ERK 1/2). Malgrat que als cardiomiòcits adults aquestes vies estan poc actives, tenen gran importància en el desenvolupament embrionari del cor (Javadov et al., 2014). No obstant això, diversos estímuls d'estrès poden activar les MAPKs. Per exemple, l'elevada formació de ROS del cor lipotòxic provoca l'activació d'aquestes vies, les quals originen una resposta inflamatòria, resistència a la

insulina, l'activació de vies apoptòtiques i hipertròfia (Li, 2013; Palomer et al., 2013; Liu et al., 2015).

El NF- κ B és un factor de transcripció que regula l'expressió de gens implicats en la inflamació, l'apoptosi i la hipertròfia (Liu et al., 2012). El NF- κ B més estudiat és el format per les subunitats p65 i p50. En situació basal, el NF- κ B es troba al citoplasma segrestat per l'inhibidor de NF- κ B (I κ B). En resposta a estímuls com citocines o estrès oxidatiu, s'activa la cinasa d'I κ B (IKK), la qual fosforila i inactiva a l'I κ B, afavorint la seva degradació proteasomal. En conseqüència, el NF- κ B pot translocar-se al nucli on activa la transcripció de gens com, per exemple, els que codifiquen per a citocines i quimiocines inflamatòries.

1.2.4. Paper protector de l'AMPK en la lipotoxicitat cardíaca

L'AMPK és un enzim heterotrimèric format per una subunitat catalítica α i dues subunitats reguladores β i γ . La principal funció de l'AMPK és la de respondre davant una situació de privació energètica i activar vies que incrementin la producció d'energia, com l'oxidació de glúcids i lípids i el metabolisme mitocondrial (Arad et al., 2007; Hardie et al., 2012). La gran importància de l'AMPK en el metabolisme fa que sigui una proteïna evolutivament conservada present a tots els eucariotes. El principal regulador de l'AMPK és l'AMP, que pot activar a l'AMPK per mecanismes al·lostèrics, per activació de cinases d'AMPK i per inhibició de fosfatases. Aquests efectes de l'AMP són contrarestats per elevades concentracions d'ATP, fet que converteix a l'AMPK en un detector molt sensible de l'estatus energètic cel·lular (Towler and Hardie, 2007). Per exemple, en una situació d'isquèmia cardíaca, el rati AMP/ATP és molt elevat i s'activa l'AMPK per estimular les vies catabòliques (Qi and Young, 2015).

A més del seu paper bioenergètic, l'AMPK està implicada en altres processos cel·lulars. Per exemple, s'ha vist un efecte antiinflamatori d'AMPK a diversos

tipus cel·lulars (Salt and Palmer, 2012) i un efecte sobre l'apoptosi dependent del tipus cel·lular (Igata et al., 2005; An et al., 2006).

L'AMPK té un paper clau en la lipotoxicitat cardíaca ja que regula molts dels esdeveniments característics del cor lipotòxic (fig. 8):

- Incrementa la biogènesi mitocondrial mitjançant l'activació del PGC-1 α (Fernandez-Marcos and Auwerx, 2011; Vega et al., 2015).
- Augmenta el catabolisme lipídic estimulant la translocació del CD36 a la membrana (Bayeva et al., 2013) i l'oxidació d'àcids grassos mitjançant la inhibició de l'ACC (Coort et al., 2007; Lopaschuk et al., 2010). A més, incrementa l'expressió del PPAR α i, per tant, dels gens activats per aquest factor de transcripció (Meng et al., 2009).
- Estimula el metabolisme glucídic ja que incrementa la translocació de les vesícules del GLUT4 a la membrana plasmàtica (Yang and Holman, 2005) i estimula la glicòlisi (Arad et al., 2007).
- Millora la sensibilitat a la insulina (Arad et al., 2007).
- Disminueix l'estrès oxidatiu i la formació d'espècies lipídiques tòxiques (Barreto-Torres et al., 2015).
- Redueix l'apoptosi causada per la lipotoxicitat (Hickson-Bick et al., 2000).
- Té un efecte antiinflamatori als cardiomiòcits (Haffar et al., 2015).

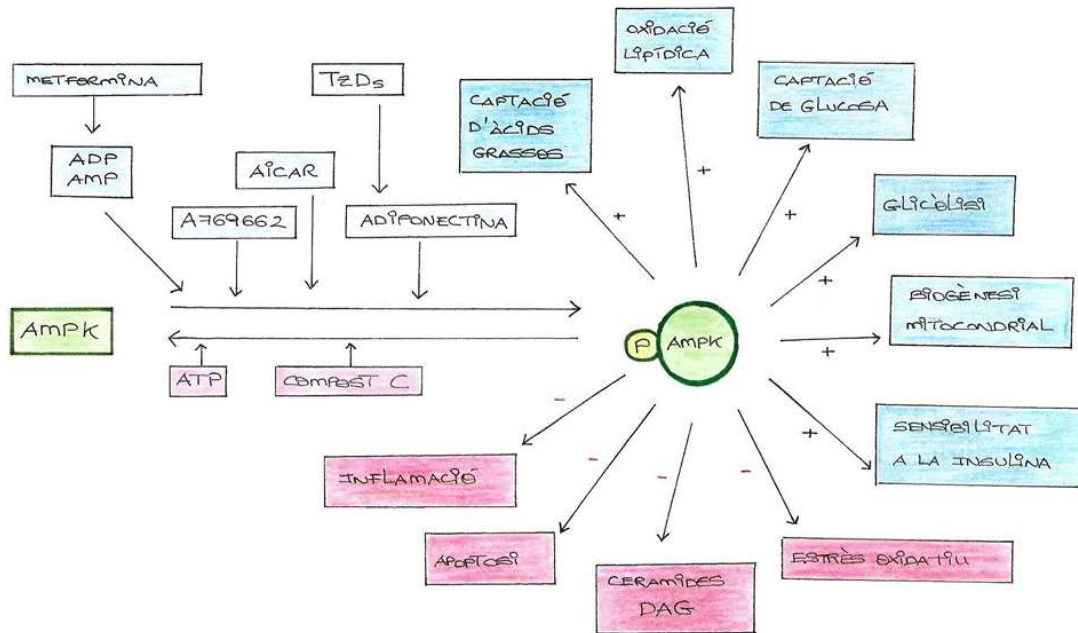


Figura 8. Efectes de l'AMPK sobre la lipotoxicitat cardíaca i fàrmacs moduladors de la seva activitat. L'activació de l'AMPK millora el perfil metabòlic del cor lipotòxic a través de l'activació de vies catabòliques, la millora de la sensibilitat a la insulina, i la disminució de l'estrès oxidatiu, de la producció d'intermediaris lipídics tòxics i de l'activació de vies apoptòtiques i inflamatores. AMPK, cinasa activada per AMP. Adaptat de Hardie et al, 2012.

1.2.4.1. L'adiponectina com a activador fisiològic de l'AMPK

L'adiponectina és una adipoquina amb efectes pleiotròpics que incrementa la sensibilitat a la insulina i la biogènesi mitocondrial a varis teixits, com el teixit adipós, el múscul esquelètic i el fetge (Brochu-Gaudreau et al., 2010). A més, disminueix la producció de citocines i quimiocines inflamatores al teixit adipós, a leucòcits i a cèl·lules endotelials, i té efectes antiaterogènics ja que activa a l'eNOS a l'endoteli (Villarreal-Molina and Antuna-Puente, 2012). Als cardiomiòcits, l'adiponectina incrementa el metabolisme lipídic i glucídic, la biogènesi mitocondrial i la sensibilitat a la insulina, i disminueix l'apoptosi i la lipotoxicitat (Caselli et al., 2014; Parker-Duffen and Walsh, 2014).

L'AMPK és el principal element efector de la via de l'adiponectina; de fet, la majoria d'efectes cardioprotectors descrits de l'adiponectina suposen una activació de l'AMPK (Caselli et al., 2014; Parker-Duffen and Walsh, 2014).

L'activació de l'AMPK per part de l'adiponectina requereix que aquesta adipoquina s'uneixi als seus receptors a les cèl·lules diana. Als cardiomiòcits, els principals receptors són el receptor 1 de l'adiponectina (AdipoR1) i la T-cadherina (T-cad), encara que també expressen baixos nivells d'AdipoR2. La T-cad, a diferència dels AdipoRs, no té domini intracel·lular, per la qual cosa s'ha suggerit que actua presentant l'adiponectina a l'AdipoR1 (Parker-Duffen and Walsh, 2014). A continuació, els AdipoRs activats interactuen a través del seu domini citosòlic amb la proteïna adaptadora APPL1, de manera que aquesta pot unir-se i activar la cinasa B1 hepàtica (LKB1), la qual fosforila al residu Thr 172 de la subunitat α de l'AMPK, activant-la (Nanayakkara et al., 2012).

1.2.4.2. L'AMPK com a diana terapèutica

Degut a la seva importància en el cor lipotòxic, així com en altres teixits, l'AMPK és considerada una de les principals dianes terapèutiques per tractar l'obesitat (fig. 8). De fet, es sap que dos dels principals grups de fàrmacs antidiabètics, les biguanides i les tiazolidinediones (TZDs), activen a l'AMPK, encara que per mecanismes diferents.

La metformina és una biguanida que té efectes hipoglucèmics ja que disminueix la gluconeogènesi hepàtica. Aquest efecte podria ser degut, almenys en part, a l'activació de l'AMPK hepàtica, la qual es dona a través de la inhibició del complex I de la cadena respiratòria que provoca un augment del rati AMP/ATP (Coughlan et al., 2014). També s'ha vist que la metformina activa l'AMPK cardíaca (Zhang et al., 2007) i endotelial (Hattori et al., 2006).

Les TZDs, com la rosiglitazona (Rsg), la pioglitazona i la troglitazona, són activadors del PPAR γ , principalment al teixit adipós. Per tant, activen la formació dels heterodímers PPAR γ -RXR als adipòcits i provoquen, entre altres respostes, una major síntesi i secreció d'adiponectina (Ahmadian et al., 2013). Així, les TZDs activen l'AMPK de manera indirecta a través de

l'adiponectina. A més, les TZDs incrementen l'adipogènesi i la capacitat d'emmagatzemar lípids del teixit adipós, de manera que redueixen la lipèmia i l'acumulació ectòpica de lípids.

Altres activadors d'AMPK són AICAR, A769662 i el salicilat. AICAR és un compost que s'internalitza dins les cèl·lules on actua com anàleg d'AMP. No obstant, també té acció sobre altres enzims dependents d'AMP, de manera que suposa un fàrmac poc atractiu per a l'obesitat (Salt and Palmer, 2012). A769662 és un potent activador de l'AMPK, amb un mecanisme similar al de l'AMP, però té l'inconvenient de tenir una baixa absorció oral (Coughlan et al., 2014). El descobriment recent de que el salicilat, component actiu de l'aspirina, activa l'AMPK obre una nova possibilitat terapèutica per a la diabetis tipus 2 (Hawley et al., 2012).

2. OBJECTIUS I PLANTEJAMENT EXPERIMENTAL

Objectius i plantejament experimental

Els estudis realitzats en aquesta tesi doctoral estan emmarcats dins un projecte més ampli desenvolupat pel Grup de Metabolisme Energètic i Nutrició de la Universitat de les Illes Balears, el qual pretén aprofundir en els mecanismes moleculars implicats en el dimorfisme sexual en la funció i la biogènesi mitocondrials, així com la seva implicació en processos patològics que tenen en comú la disfunció mitocondrial, com la resistència a la insulina i la lipotoxicitat. Concretament, l'objectiu general d'aquesta tesi ha estat investigar el paper dels estrògens en la regulació de la funció i la biogènesi mitocondrials del múscul cardíac, i els efectes que tenen aquestes hormones sobre la lipotoxicitat cardíaca. Per a la consecució d'aquest objectiu s'han combinat estudis *in vivo* emprant la rata com a animal d'experimentació i estudis *in vitro* amb cardiomiòcits H9c2.

Estudis previs realitzats pel nostre grup d'investigació demostren una major diferenciació mitocondrial cardíaca a les rates femella respecte als mascles (Colom et al., 2007b). Resultats similars s'han obtingut a altres teixits de rata com el teixit adipós blanc (Amengual-Cladera et al., 2012), el teixit adipós marró (Nadal-Casellas et al., 2013), el fetge (Justo et al., 2005; Valle et al., 2007; Nadal-Casellas et al., 2010), el múscul esquelètic (Colom et al., 2007a; Gómez-Pérez et al., 2008) i el cervell (Guevara et al., 2009). L'estrès oxidatiu també mostra un dimorfisme sexual ja que el cor de les rates femella genera menys H₂O₂ i presenta menys dany oxidatiu que el dels mascles (Colom et al., 2007b). Les hormones sexuals podrien ser responsables, almenys en part, d'aquestes diferències atès que s'ha vist que participen en la regulació de mediadors que intervenen en el programa de biogènesi mitocondrial a distints teixits (Klinge, 2008; Chen et al., 2009a; Velarde, 2014). A més, en un estudi previ realitzat al nostre grup vàrem demostrar que el 17β-estradiol (E₂) juga un paper important en la regulació de la biogènesi mitocondrial al múscul esquelètic (Capllonch-Amer et al., 2014b). No obstant això, els efectes de l'E₂

sobre la biogènesi i la funció mitocondrials cardíques encara no han sigut elucidats.

Tenint en compte la importància del metabolisme energètic en el correcte funcionament del cor, l'estudi de la modulació de la funció i la biogènesi mitocondrials cardíques per part de l'E₂ contribuiria al coneixement dels mecanismes moleculars associats a l'increment de la patologia cardíaca després de la menopausa (Ostadal et al., 2009; Mikkola et al., 2013), etapa en la qual disminueixen els nivells circulants d'estrògens. En aquesta línia, el **primer objectiu** de la present tesi doctoral ha estat estudiar el paper de l'E₂ en el dimorfisme sexual en la funció i la biogènesi mitocondrials i en l'estrès oxidatiu al múscul cardíac, així com analitzar la contribució dels diferents receptors estrogènics als efectes de l'E₂. Per desenvolupar aquest objectiu es varen emprar rates ovariectomitzades com a model de privació crònica d'hormones ovàriques i es va analitzar si l'ovariectomia afectava la funció i la biogènesi mitocondrials i l'estrès oxidatiu cardíacs. A la meitat de les rates ovariectomitzades se'ls va administrar E₂ amb l'objectiu de determinar si aquesta hormona podia revertir els efectes de l'ovariectomia. Al múscul cardíac es va determinar el consum d'oxigen, la producció de peròxids, els nivells de marcadors de funció i biogènesi mitocondrials i d'estrès oxidatiu, i els nivells dels diferents receptors d'estrògens. Es varen utilitzar també cardiomiòcits H9c2 els quals varen ser tractats amb E₂ i amb agonistes i antagonistes específics d'ER α , ER β i GPER per a determinar quins receptors mediaven els efectes de l'E₂ sobre la funció i la biogènesi mitocondrials cardíques. Els resultats i la discussió corresponents a aquest estudi es troben a l'apartat 4.1 i s'han recollit en un manuscrit que ha estat publicat a la revista *Molecular and Cellular Endocrinology*.

La funció i la biogènesi mitocondrials juguen un paper clau en el desenvolupament i la progressió de la lipotoxicitat al múscul cardíac. En condicions d'elevada lipèmia, el miocardi modifica el seu metabolisme

incrementant l'oxidació dels àcids grassos i reduint la de glucosa. Aquest canvi del perfil metabòlic suposa un increment de la biogènesi mitocondrial per oxidar l'elevat subministrament lipídic i per minimitzar l'acumulació de lípids dins els cardiomiòcits. No obstant això, mantenir aquest patró metabòlic condueix eventualment al desenvolupament de lipotoxicitat en forma d'esteatosi cardíaca, estrès oxidatiu, disfunció mitocondrial i inflexibilitat metabòlica, entre d'altres (Schilling, 2015). En l'etiologia de la lipotoxicitat cardíaca, doncs, hi juguen un paper clau els lípids circulants, els quals provenen en gran part del teixit adipós. Així, l'alimentació amb una dieta hiperlipídica (HFD) provoca una disfunció del teixit adipós que resulta en una menor capacitat d'emmagatzemar lípids en aquest teixit, de manera que aquests es depositen a altres òrgans, entre ells el cor (Van de Voorde et al., 2013). Aleshores, una de les estratègies per disminuir la lipotoxicitat cardíaca és actuar sobre el teixit adipós. En aquest sentit, les tiazolidinediones, com la rosiglitazona (Rsg), són un grup de fàrmacs que incrementen l'adipogènesi, de manera que el teixit adipós pot emmagatzemar més lípids i, conseqüentment, disminueix l'esteatosi cardíaca. A més, aquests fàrmacs incrementen la síntesi i secreció d'adiponectina al teixit adipós, una adipoquina amb efectes cardioprotectors (Ahmadian et al., 2013).

Tenint en compte aquests antecedents i el dimorfisme sexual descrit en la funció i la biogènesi mitocondrials i en l'estrès oxidatiu cardíacs (Colom et al., 2007b), el **segon objectiu** d'aquesta tesi s'ha centrat en analitzar si aquest dimorfisme sexual es conserva en el desenvolupament d'una lipotoxicitat cardíaca originada per la ingesta d'una HFD, així com en la resposta del cor lipotòxic a l'administració de Rsg. Per assolir aquest objectiu, es va desenvolupar un estudi amb rates Wistar d'ambdós sexes alimentades amb una HFD durant 16 setmanes per tal d'induir hiperlipèmia i lipotoxicitat al miocardi. La meitat dels animals alimentats amb la HFD reberen Rsg durant les dues darreres setmanes del tractament dietètic. Es varen analitzar

paràmetres sèrics indicadors de resistència a la insulina i els nivells circulants de TG, d'àcids grassos lliures i d'adipoquines. Al múscul cardíac es varen determinar marcadors del metabolisme lipídic i glucídic, de la funció i la biogènesi mitocondrials, de l'estrès oxidatiu i d'elements de la via de senyalització de l'adiponectina i la insulina. Aquest estudi es va complementar amb cultius de cardiomiòcits H9c2 tractats amb palmitat per induir lipotoxicitat i disfunció mitocondrial, en combinació amb E₂ per analitzar la influència d'aquesta hormona sobre una situació lipotòxica. Els resultats i la discussió d'aquest estudi es troben a l'apartat 4.2., i s'han recollit en un manuscrit que es troba en vies de publicació.

En una situació de lipotoxicitat avançada, l'elevada producció de ROS provoca l'activació de vies inflamatòries, com les MAPKs, les quals eventualment poden desembocar en una disfunció cardíaca (Li, 2013; Palomer et al., 2013; Liu et al., 2015). S'ha descrit que els estrògens atenuen l'activació de les MAPKs a cardiomiòcits (Kim et al., 2006; Liu et al., 2009; Nanayakkara et al., 2012), però es desconeixen els mecanismes a través dels quals aquestes hormones exerceixen els seus efectes antiinflamatoris. L'estudi del possible paper de l'AMPK, un sensor energètic cel·lular que atenua l'activació de les vies inflamatòries a diferents tipus cel·lulars (Salt and Palmer, 2012), en els efectes antiinflamatoris dels estrògens a cardiomiòcits constitueix l'eix del **tercer objectiu** d'aquesta tesi. Concretament, s'ha analitzat si els efectes de l'E₂ inhibint les MAPKs en una situació de lipotoxicitat depenen de l'activació de l'AMPK per part d'aquesta hormona. Per assolir aquest objectiu, es va dur a terme un estudi amb cardiomiòcits H9c2, els quals varen ser tractats amb palmitat per activar les vies inflamatòries, en combinació amb E₂ i compost c, un inhibidor de l'AMPK, per analitzar si l'E₂ conserva la seva capacitat antiinflamatòria quan s'inhibeix l'AMPK. A l'apartat 4.3 es troben els resultats i les discussions corresponents a aquest estudi.

Tenint en compte la importància de l'AMPK com a diana terapèutica per tractar patologies metabòliques i inflamatòries, ens vàrem proposar indagar en els mecanismes antiinflamatoris d'aquesta cinasa. Per això, durant el desenvolupament de la tesi doctoral, el doctorant va realitzar una estada d'investigació de tres mesos al *Institute of Cardiovascular and Medical Sciences*, de la Universitat de Glasgow, sota la direcció del Dr. Ian P. Salt. Durant aquest període va participar activament en una sèrie d'experiments per assolir el **quart objectiu** de la present tesi doctoral el qual té com eix central l'estudi dels efectes antiinflamatoris de l'AMPK sobre les vies del NF- κ B i les MAPKs p38 i JNK a cèl·lules endotelials. Concretament, es va investigar si els efectes de l'AMPK atenuant aquestes vies eren deguts a la inhibició de la TAK1, una proteïna *upstream* comú de la via del NF- κ B i de les MAPKs. A més, es va analitzar el possible *crossstalk* entre aquestes dues vies inflamatòries per estudiar si aquest podia ser modulats per l'AMPK. Per a dur a terme aquest objectiu es varen utilitzar cèl·lules endotelials de vena de cordó umbilical humà (HUVECs) les quals varen ser estimulades amb IL-1 β per activar les vies inflamatòries i tractades amb A769662 per activar a l'AMPK. Els resultats i la discussió d'aquest estudi es troben a l'apartat 4.4.

3. MATERIALS I MÈTODES

3.1. Estudis *in vivo*

3.1.1. Animals i tractaments

Tots els tractaments *in vivo* es dugueren a terme d'acord amb les directrius de la Unió Europea (2010/63/UE) i del Comitè d'Ètica d'Experimentació Animal de la Universitat de les Illes Balears. Els animals varen ser mantinguts en l'estabulari d'aquesta universitat, una instal·lació autoritzada de nivell 2 per animals d'investigació. Es mantingué una temperatura de 22°C amb una humitat relativa del $65 \pm 3\%$ i un fotoperíode de 12h de llum i 12h d'obscuritat. Es varen estabular dos animals per gàbia amb lliure accés a l'aigua i al pinso.

Per a dur a terme els experiments es varen emprar rates (*Rattus norvegicus*) de la soca Wistar obtingudes de Charles River Laboratories (Barcelona, Espanya). Després de l'arribada a l'estabulari els animals varen estar en quarantena durant una setmana i en un període mínim d'adaptació d'una setmana abans d'iniciar els tractaments.

El sacrifici dels animals va ser per decapitació. Es va descartar l'ús d'anestèsics degut a l'alteració que aquests provoquen als nivells circulants de glucosa (Saha et al., 2005), de manera que haguessin pogut alterar-se els paràmetres a estudiar.

3.1.1.1. Experiment amb rates ovariectomitzades

Es varen emprar rates femella control i ovariectomitzades a les 5 setmanes d'edat (fig. 9A). La intervenció quirúrgica es va realitzar al propi laboratori d'origen (Charles River Laboratories). Els animals varen ser alimentats durant tot l'experiment amb una dieta estàndard (A04, Scientific Animal Food & Engineering –SAFE-, París, França). A les 10 setmanes els animals varen ser dividits en tres grups experimentals: control (n=6), rates ovariectomitzades (OVX, n=6) i rates ovariectomitzades tractades amb E₂ (OVX+E2, n=6).

L'E₂ (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EEUU) es va administrar per injecció subcutània (10 µg per kg de pes corporal) cada 48 hores durant les quatre setmanes prèvies al sacrifici. El grup OVX rebé dosis similars de vehicle (oli de blat de moro, Sigma-Aldrich). Durant l'estudi es dugueren a terme controls setmanals de pes corporal i d'ingesta. A les 14 setmanes d'edat i després d'un dejuni nocturn, es varen sacrificar els animals. El cicle estral del grup control va ser monitoritzat mitjançant la mesura de la impedància de la paret vaginal (Impeast®, Cibertec, Madrid, Espanya) i també amb exàmens citològics del frotis vaginal, de tal manera que les rates control es trobaven en fase de diestre en el moment del sacrifici.

El cor fou extret ràpidament i rentat dins sèrum salí fred per eliminar la sang. Una petita porció fou emprada per obtenir les miofibres cardíaques, mentre que la resta es va congelar amb nitrogen líquid i s'emmagatzemà a -80°C fins el seu ús posterior. Altres teixits d'interès també varen ser extrets i emmagatzemats. Es va recollir la sang de coll, la qual es deixà coagular durant 20 minuts i, posteriorment, es centrifugà a 1000g durant 10 minuts a 4°C per obtenir el sèrum, que fou aliquotat i emmagatzemat a -80°C fins el seu anàlisi.

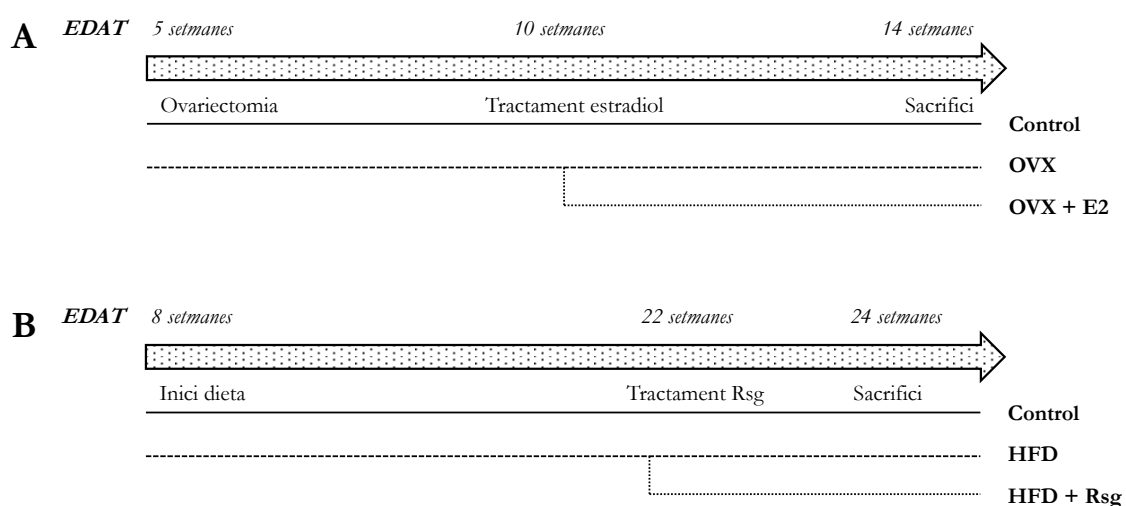


Figura 9. Esquema de l'experiment realitzat amb rates ovariectomitzades (A) i amb rates alimentades amb una dieta hiperlipídica (B).

3.1.1.2. Experiment amb rates alimentades amb dieta hiperlipídica

Es varen emprar rates Wistar d'ambdós sexes de 8 setmanes d'edat. Els animals varen ser dividits en tres grups experimentals de mascles i tres de femelles de pes corporal inicial similar a cada sexe (fig. 9B).

-Grup control, alimentat amb una dieta estàndard durant 16 setmanes (dieta 210, SAFE). La composició de la dieta es presenta a la taula 1.

-Grup HFD, alimentat amb dieta hiperlipídica (HFD) durant 16 setmanes (dieta 235, SAFE) amb l'objectiu de provocar un increment del pes corporal, de l'adipositat i de la lipèmia. A més, aquesta dieta contenia un elevat contingut en sacarosa, un disacàrid que al tracte digestiu dona lloc als dos monosacàrids que el formen, glucosa i fructosa. S'ha vist que elevades ingestes de fructosa incrementen la lipogènesi *de novo* al fetge, de manera que augmenta la trigliceridèmia (Basciano et al., 2005).

-Grup HFD+Rsg, alimentats amb una HFD i tractats amb rosiglitazona (Rsg). La Rsg (Sequoia Research Products, Pangbourne, Regne Unit) s'administrà unida a la dieta (100 mg per kg de pinso), la qual cosa equival a una dosi aproximada de 4 mg Rsg/kg pes corporal per dia. La Rsg es va administrar durant les 2 darreres setmanes prèvies al sacrifici.

Durant les primeres 14 setmanes de tractament es dugué a terme un control d'ingesta i de pes corporal cada 14 dies. Durant les dues darreres setmanes, coincidint amb l'administració de Rsg, aquest control fou diari. Els animals varen ser sacrificats a les 24 setmanes d'edat. Les rates femelles es trobaven en fase de diestre en el moment del sacrifici. El cor i altres teixits d'interès, així com la sang de coll per obtenir el sèrum, varen ser processats com a l'experiment amb rates ovariectomitzades (veure apartat 3.1.1.1.).

Paral·lelament, i amb l'objectiu d'estudiar la sensibilitat tissular a la insulina, a la meitat dels animals se'ls va injectar insulina 5 U/kg per via intraperitoneal

20 minuts abans del seu sacrifici, mentre que a la resta d'animals se'ls va injectar el vehicle de la insulina (sèrum salí). D'aquesta manera, s'obtingueren 6 grups de rates mascle i femella controls, HFD i HFD+Rsg, tot ells tractats amb sèrum salí, i 6 grups de rates tractades amb insulina. Cada un d'aquests grups estava format per 7 animals.

Taula 1. Composició calòrica i nutritiva de les dietes emprades. Font: SAFE.

	Dieta control	HFD
Aportació calòrica (kcal/kg)	3438	4397
Proteïnes (%)	19.6	17
Lípids (%)	5	22.5
<i>Saturats (%)</i>	1.73	8.3
<i>Monoinsaturats (%)</i>	2.27	10.7
<i>Polinsaturats (%)</i>	1	3.5
Glúcids (%)	64	49.5
<i>Sacarosa (%)</i>	-	29.3
<i>Glucosa (%)</i>	38	-
<i>Midó (%)</i>	20	13
<i>Celulosa (%)</i>	6	5
<i>Maltodextrina (%)</i>	-	2.2

3.1.2. Determinació de la tolerància a la glucosa

El test de tolerància a la glucosa és una prova analítica que consisteix en administrar una càrrega elevada de glucosa i monitoritzar com es recupera la glicèmia al llarg del temps. Aquesta prova informa de la capacitat del pàncrees de secretar insulina en resposta a un increment de la glicèmia així com de la captació de glucosa pels teixits perifèrics en resposta a la insulina. Aquest anàlisi es dugué a terme a les rates de l'experiment amb dieta hiperlipídica (apartat 3.1.1.2.) quatre dies abans del seu sacrifici. Després d'un dejuni de 12 hores, es va extreure sang de la vena safena i es va mesurar la glicèmia (temps 0) mitjançant el sistema Accutrend® (Roche Diagnostics, Basilea, Suïssa). Seguidament s'injectà glucosa (2 g/kg pes corporal) per via intraperitoneal i es

mesurà la glicèmia als 15, 30, 60 i 120 minuts. Representant la glicèmia al llarg del temps s'obté la corba de tolerància a la glucosa.

3.1.3. Determinació dels paràmetres circulants

La glucosa i els TG circulants varen ser analitzats amb el sistema Accutrend® (Roche Diagnostics) a partir de sang de vena safena minuts abans del sacrifici dels animals. Els nivells sèrics d'adiponectina i de leptina es varen mesurar mitjançant un kit ELISA comercial (Millipore, MA, EUA). La mateixa tècnica fou emprada per a determinar els nivells circulants d'E₂ i de progesterona (DRG Instruments, Marburg, Alemanya). Els àcids grassos no esterificats (NEFAs) es varen determinar a partir del sèrum amb un kit colorimètric (Wako Chemicals GmbH, Alemanya).

En el cas de l'E₂ va ser necessària una concentració prèvia de la fracció orgànica del sèrum (Dighe and Sluss, 2004). Per a fer-ho, 1 ml de sèrum va ser diluït amb 10 ml de solució hexà:etil acetat 3:2. Es va agitar vigorosament la mostra durant 30 segons, es varen deixar separar les fases a temperatura ambient i es va sotmetre a -20°C durant 30 minuts. D'aquesta manera, es va congelar la fase aquosa, mentre que l'orgànica –que contenia l'E₂- seguia en estat líquid i es va poder separar de l'aquosa. Després de retirar la fase orgànica, es va deixar descongelar la fracció aquosa, s'afegiren altre cop 10 ml de la solució hexà:etil acetat i es va repetir el procés d'extracció de la fase orgànica a fi de maximitzar l'obtenció d'E₂. Finalment, es varen unir els dos extractes orgànics, s'assecaren amb un flux de nitrogen i es va resuspendre la fracció orgànica en sèrum lliure d'esteroides (Charcoal FBS, Biological Industries, Beit-Haemek, Israel).

3.1.4. Preparació dels homogenats de múscul cardíac

Porcions d'aproximadament 0.1g de múscul cardíac varen ser introduïdes en 1 ml de tampó d'homogeneïtzació, els components del qual estan especificats a la taula 2.

Taula 2. Composició del tampó d'homogeneïtzació del múscul cardíac

Compost	Funció
Tris 20 mM pH 7.4	Permet el manteniment del pH del medi
Sacarosa 250 mM	Estabilitza la membrana lisosomal i evita l'alliberació de proteases
EGTA 2 mM	Agent quelant d'ions de calci i inhibidor de proteases
KCl 40 mM	Manteniment de la força iònica del medi
PMSF 1 mM	Inhibidor de serina proteases
Pepstatina 10 µM	Inhibidor d'aspartat proteases
Leupeptina 10 µM	Inhibidor de cisteïna i serina proteases
Na ₃ VO ₄ 1 mM	Inhibidor de tirosina fosfatases

Les porcions de múscul cardíac varen ser esmicolades amb unes tisores i homogeneïtzades en fred amb un dispersor tipus Polytron (T10 basic, IKA-Werke GmbH, Staufen, Alemanya). Aquest sistema es basa en unes aspes tallants que giren a moltes revolucions per minut, creant forces de cisallament que rompen la membrana cel·lular i estructures subcel·lulars. A continuació, l'homogenat es va sonicar en fred dues vegades amb una potencia de 20 W amb un interval de 85 segons entre ambdós polsos. La sonicació permet la formació per cavitació de microbombolles que poden impactar i rompre membranes cel·lulars. Finalment, l'homogenat va ser centrifugat a 600g durant 10 minuts a 4°C per precipitar el material no homogeneïtzat.

3.1.5. Permeabilització de miofibres cardíques

El mètode seguit per a la permeabilització de les miofibres cardíques és una modificació del protocol original de Burelle (Burelle and Hochachka, 2002). Es va depositar aproximadament 1 mg de múscul cardíac en solució A freda (CaK₂EGTA 2.77 mM, K₂EGTA 7.23 mM, MgCl₂ 6.56 mM, ditiotreitòl 0.5

mM, K-MES 50 mM, imidazol 20 mM, taurina 20 mM, Na_2ATP 5.3 mM, fosfocreatina 15 mM, pH 7.3). Mitjançant agulles fines i bisturí, i amb l'ajuda d'una lupa, es varen separar les miofibres unes de les altres, es pesaren, es depositaren en tubs que contenien la solució A suplementada amb 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de saponina i es va incubar 30 minuts a 4°C. La saponina és un detergent que interactua amb elevada selectivitat amb el colesterol de la membrana cel·lular, de manera que promou la seva eliminació i la creació de porcs a la membrana a través dels quals es poden introduir molècules d'interès dins les cèl·lules.

Després de la permeabilització es varen dur a terme tres rentats de les miofibres durant 10 minuts amb solució B freda (CaK_2EGTA 2.77 mM, K_2EGTA 7.23 mM, MgCl_2 1.38 mM, ditiotretitol 0.5 mM, KH_2PO_4 3 mM, imidazol 20 mM, K-MES 100 mM, taurina 20 mM, pH 7,3) suplementada amb 2 mg/ml d'albumina sèrica bovina (BSA). Es varen mantenir les miofibres en solució B a 4°C fins el seu ús, que no va ser més de 2 hores després de la seva obtenció.

Encara que la saponina a les concentracions emprades no ha d'afectar les membranes dels orgànuls, el mètode de permeabilització va ser avaluat mitjançant el test del citocrom c (Saks et al., 1998). Aquest anàlisi es basa en que el citocrom c s'allibera de l'espai intermembrana quan la cèl·lula està danyada, de manera que disminueix la taxa de respiració. Si al medi s'afegeix citocrom c oxidat es restableix la respiració. D'aquesta manera, es mesurà la respiració de les miofibres mitjançant l'elèctrode de Clark (veure apartat 3.4.1) en un medi que contenia KCl 125 mM, HEPES 20 mM, glutamat 4 mM, malat 2 mM, MgCl_2 3 mM, KH_2PO_4 5 mM, DTT 0.3 mM, pH 7.1 a 25°C. Durant la determinació del consum d'oxigen s'afegí de manera seqüencial ADP 1 mM i citocrom c oxidat 8 μM . Si el citocrom c no altera la taxa de respiració significa que no s'ha alliberat citocrom c de l'espai intermembrana i, per tant, la saponina no ha actuat sobre la membrana mitocondrial externa.

3.1.6. Obtenció del RNA

L'extracció del RNA es dugué a terme amb el TriPure Isolation Reagent® (Roche Diagnostics, Basilea, Suïssa) seguint les instruccions del fabricant. Es tracta d'un reactiu que conté fenol, de manera que cal treballar amb una campana de gasos degut a la seva toxicitat.

El TriPure implica una extracció amb fenol:cloroform, un mètode que es basa en una separació de fases per centrifugació d'una mostra que conté fenol, cloroform i un agent caotròpic (en aquest cas, tiocianat de guanidina). El TriPure conté també inhibidors de RNAses per protegir la mostra. Aproximadament 50 mg de múscul cardíac varen ser homogeneïtzats amb 1 ml de TriPure i posteriorment s'afegí cloroform. En presència de fenol i del tiocianat de guanidini, les proteïnes es desnaturalitzen i es tornen hidròfobes, de manera que es dissolen en fenol. Les molècules de RNA presenten major polaritat que les de DNA degut a la presència dels grups -OH de la ribosa. Així, després de centrifugar, s'obté una fase superior aquosa incolora que conté el RNA, i una fase orgànica (fenòlica) inferior de color rosat que conté les proteïnes i el DNA. Pot haver-hi una interfase que pot contenir molècules de DNA, de manera que cal anar molt amb compte a l'hora de separar les dues fases. A continuació, el RNA es va precipitar amb isopropanol, es va rentar amb etanol 75% i es va disoldre amb aigua lliure de RNAses.

Després de la seva purificació, el RNA es va quantificar amb un espectrofotòmetre mesurant l'absorbància a 260 nm i s'analitzà la qualitat de l'extracció amb el rati A_{260}/A_{280} , indicador de la puresa del RNA i la presència de proteïnes. Aquest rati es basa en que les bases nitrogenades dels àcids nucleics tenen un màxim d'absorció a 260 nm i una molt baixa absorbància a 280 nm, mentre que les proteïnes tenen un màxim d'absorció a 280 nm. Un rati A_{260}/A_{280} adequat per una extracció de RNA té un valor de 1.9-2.1. Valors inferiors a 1.9 són indicadors de la presència de contaminants

com proteïnes o fenol. Finalment el RNA s'emmagatzemà a -80°C per a la seva posterior utilització.

3.1.7. Obtenció del DNA

Per a l'obtenció del DNA de les mostres procedents de l'experiment amb rates ovariectomitzades es partí de la separació de fases obtinguda durant l'extracció de RNA amb el Tripure® seguint les instruccions del fabricant. Una vegada separada la fase aquosa superior que conté el RNA, es va afegir etanol absolut a la fase orgànica inferior. El DNA no és soluble en etanol, de manera que precipita i es pot separar de la fase superior que conté les proteïnes dissoltes en fenol i etanol. Seguidament es varen eliminar les restes de fenol amb citrat sòdic dissolt amb etanol 10%. Els cations sodi interaccionen amb els fosfats carregats negativament del DNA, de manera que aquest es fa menys hidrofílic i precipita. Finalment, es va dur a terme un rentat amb etanol 75% i es va disoldre el DNA amb aigua lliure de DNAses.

Pel que fa a les mostres de l'experiment amb rates alimentades amb una dieta hiperlipídica, l'extracció del DNA es va realitzar mitjançant un kit comercial (Analytik Jena, Jena, Alemanya) seguint les instruccions del fabricant. Aquest kit es basa en lisar el teixit mitjançant la proteïnasa K i posteriorment s'aïlla el DNA mitjançant columnes de centrifugació.

Una vegada obtingut el DNA, aquest va ser quantificat mitjançant la mesura de l'absorbància a 260 nm, i s'analitzà la qualitat de la purificació amb el rati A_{260}/A_{280} . En aquest cas, el rati correcte té un valor de 1.8-2, inferior al del RNA degut a la presència de timina en lloc d'uracil. Les mostres es varen emmagatzemar a -20°C fins el seu ús.

3.1.8. Digestió amb NaOH

Els mètodes per homogeneïtzar els teixits i mantenir intactes els components cel·lulars no són capaços de disgregar tot el teixit. Per això, si es vol mesurar la concentració de proteïnes i de DNA d'un teixit, cal efectuar una lisi total

d'aquest. Un dels mètodes per aconseguir-ho és una digestió amb NaOH a temperatures elevades. Aproximadament 20 mg de múscul cardíac varen ser digerits amb NaOH 0.5 N mantenint una relació de 1/10 (p/v) a 60°C durant 90 minuts. Les mostres digerides varen ser emmagatzemades a -20°C fins el posterior anàlisi de la concentració de proteïnes i DNA (veure seccions 3.4.3 i 3.4.4).

3.2. Estudis amb cardiomiòcits H9c2

3.2.1. Característiques dels cardiomiòcits H9c2

La línia cel·lular H9c2 (American Type Culture Collection) va ser obtinguda a partir del ventricle d'embrions de rates BDIX (Kimes and Brandt, 1976). Es tracta de cèl·lules adherents de morfologia mioblàstica que, encara que no tenen activitat contràctil, presenten característiques bioquímiques, elèctriques i morfològiques típiques de cèl·lules cardíques. D'aquí que siguin un model *in vitro* molt emprat per estudiar l'efecte de fàrmacs a cardiomiòcits.

La manipulació de les cèl·lules H9c2 es va realitzar en condicions habituals de cultiu cel·lular, és a dir, mantenint un ambient estèril per a reduir el risc de contaminació. Gran part de les solucions i del material fungible (plaques, medis, sèrum, etc.) es va adquirir ja estèrils, mentre que la resta de material es va esterilitzar mitjançant diferents mètodes: autoclau, irradiació amb raigs ultraviolats, filtres de 0.22 µm de diàmetre de porus, etc. Es va treballar amb cabines de seguretat de classe I ja que aquesta línia cel·lular requereix un nivell de bioseguretat 1

3.2.2. Procediments generals de cultius

3.2.2.1. Manteniment i subcultiu

Les cèl·lules H9c2 es varen mantenir a 37°C en una atmosfera al 5% de CO₂. El medi de cultiu rutinari era DMEM amb una elevada concentració de glucosa (4.5 g/l) (Biowest, Nuaille, France) suplementat amb un 10% de sèrum fetal boví (FBS) (Biological Industries, Beit-Haemek, Israel) i antibiòtics (penicil·lina 100 U/ml, estreptomina 0.1 mg/ml, Biological Industries). Aquest medi s'identificarà al text com "medi complet". Pel manteniment d'un estoc de cèl·lules s'empraren plaques p100, les quals tenen una superfície aproximada de creixement de 55 cm². El canvi de medi es va efectuar cada 2-3

dies. Com a protocol general de manteniment es varen seguir les instruccions de la casa comercial.

Quan la confluència cel·lular era elevada (70-80%) es realitzaven subcultius mitjançant una solució amb un 0.25% de tripsina i un 0.02% d'EDTA. L'acció peptidasa de la tripsina i l'acció quelant del calci de l'EDTA rompen els enllaços de la matriu extracel·lular responsables de mantenir les cèl·lules unides entre si i adherides a la placa, de manera que s'obtenen les cèl·lules en suspensió per a posteriorment fer-les créixer en plaques noves. El medi de cultiu, però, té una elevada concentració proteica que dificultaria aquesta acció proteolítica, de manera que en primer lloc es va aspirar el medi i s'eliminaren les possibles restes de medi amb un rentat amb tampó PBS. Aleshores, per una placa p100 es varen introduir 1.5 ml de tripsina-EDTA i es va deixar incubar durant cinc minuts a 37°C, temps suficient per a desenganxar les cèl·lules de la placa. Passat aquest temps es va inactivar la solució de tripsina-EDTA amb 4.5 ml de medi complet. Finalment, les cèl·lules recollides varen sembrar-se en una placa nova. Per a les cèl·lules H9c2 es recomana un rati de subcultiu de 1:2 a 1:4 i una densitat de sembra mínima de 10^4 cèl·lules/cm². Addicionalment, es pot efectuar un comptatge de les cèl·lules amb una cambra de Neubauer. Per a fer-ho, es mescla un petit volum de cèl·lules recollides (per exemple, 15 µl) amb un volum equivalent del colorant vital blau de tripan, i es deposita la mescla a la cambra de Neubauer.

3.2.2.2. Congelació i descongelació

És important mantenir estocs congelats de les línies cel·lulars a les primeres subdivisions, ja que quan s'han realitzat un nombre elevat de subcultius les cèl·lules tendeixen a perdre algunes característiques fenotípiques. A més, en cas de contaminació es poden descartar totes les plaques en ús i emprar un estoc congelat.

Per a la congelació, les cèl·lules en estat de subconfluència varen ser desenganxades de la placa amb solució de tripsina com s'ha indicat anteriorment. Seguidament, la suspensió cel·lular va ser traspasada a un tub estèril de 15 ml i es va centrifugar a 130g durant 6 minuts. El pellet cel·lular resultant es va resuspendre amb 1 ml de medi complet suplementat amb un 5% de dimetilsulfòxid (DMSO), un crioprotector que impedeix la formació de cristalls que poden lisar les cèl·lules. La solució cel·lular es va traspasar dins un criovial i aquest es va emmagatzemar a -80°C dins un tanc de congelació Mr. Frosty™ (Thermofisher) que contenia isopropanol. Aquest sistema permet una congelació progressiva de les mostres mitjançant una baixada de 1°C cada minut per aconseguir una criopreservació òptima de les cèl·lules. Passat un mínim de tres hores, els criovials s'introdueixen en una atmosfera de nitrogen, en la qual les cèl·lules poden ser emmagatzemades durant varis anys.

La descongelació de les cèl·lules cal que es dugui a terme de forma ràpida ja que el DMSO és tòxic per a les cèl·lules i s'ha d'eliminar el més aviat possible. Per això, les cèl·lules H9c2 es descongelaren ràpidament en un bany a 37°C i varen ser introduïdes dins un tub amb medi complet. Es va afegir varies vegades medi complet dins el criovial amb la finalitat de recollir el màxim nombre de cèl·lules. A continuació es va dur a terme una centrifugació a 130g durant 6 minuts, es va resuspendre el pellet cel·lular amb medi complet i es va transferir a una placa p100.

3.2.2.3. Diferenciació

Les cèl·lules H9c2 es diferencien a cardiomiòtubs quan els cardiomioblasts es fusionen i formen cèl·lules multinucleades amb forma allargada. Tot i que el cor adult conté principalment cardiomiòcits diferenciats, molts dels estudis amb H9c2 es fan sense diferenciar les cèl·lules, la qual cosa fa difícil extrapolar els resultats a un sistema *in vivo*. De fet, es sap que el procés de diferenciació d'aquestes cèl·lules comporta un canvi en el perfil d'expressió de proteïnes claus pel funcionament cel·lular (Branco et al., 2015). Així, els cardiomiòtubs

incrementen l'expressió de proteïnes sarcomèriques i de transportadors de calci, estimulant així la maquinària contràctil. La diferenciació dels cardiomiòcits comporta també una major expressió de gens per a la biogènesi mitocondrial i l'oxidació lipídica, originant un fenotip metabòlic típic dels cardiomiòcits adults (Porter et al., 2011; Branco et al., 2015). A més, augmenta l'expressió del IRS1 i del GLUT4, de manera que hi ha una major resposta a la insulina (Nobuhara et al., 2013). Per totes aquestes raons, els estudis realitzats en aquesta tesi doctoral s'han fet amb cardiomiòcits H9c2 diferenciats.

La diferenciació de les cèl·lules H9c2 es va aconseguir disminuint la concentració del sèrum del medi fins un 1% quan les cèl·lules estaven en subconfluència, provocant el segrest del cicle cel·lular degut a la menor presència de factors de creixement. Després de tres dies, pràcticament el 100% de les cèl·lules H9c2 estaven diferenciades i es va procedir a realitzar els tractaments.

3.2.2.4. Anàlisi de la contaminació per micoplasma

Els micoplasmes són bacteris responsables de la major part de les contaminacions als cultius cel·lulars. A diferència d'una contaminació fúngica o d'altres tipus de bacteris, la contaminació per micoplasma no es detecta a simple vista o al microscopi, de manera que cal realitzar anàlisi específics.

Periòdicament es va realitzar un test de detecció de micoplasma del medi i del cultiu cel·lular mitjançant un kit colorimètric específic basat en la detecció de metabòlits específics d'aquest bacteri (Biotool, Houston, EUA). Quan la coloració de les mostres equivalia a la del control positiu del kit, aquestes estaven contaminades i es descartaren tots els medis i plaques operatius.

3.2.3. Tractaments

Les cèl·lules H9c2 es sembraren a plaques p6, que tenen una superfície de creixement de 9.5 cm², si havien de ser recollides per realitzar Western blots o

s'havia d'obtenir el seu RNA. Quan s'havia d'analitzar la viabilitat cel·lular s'empraren plaques de 96 pouets.

Abans dels tractaments, les cèl·lules H9c2 diferenciades varen ser incubades durant 24h amb medi DMEM sense roig fenol (Biowest) ja que aquest indicador de pH té una lleu activitat estrogènica (Berthois et al., 1986). Aquest DMEM contenia FBS 1% lliure de molècules no polars (Charcoal FBS, Biological Industries) per evitar interferència per part d'hormones esteroides.

Els tractaments es dugueren a terme quan les cèl·lules havien estat subcultivades entre 18 i 25 vegades respecte el seu origen (5-12 respecte el vial que es va adquirir). Les concentracions i temps dels tractaments estan indicats en la taula 3. Cal destacar que quan s'empraren inhibidors, aquests s'afegiren 1 hora abans i es mantingueren durant els posteriors tractaments.

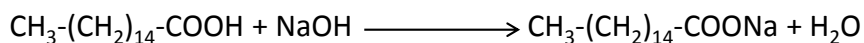
Taula 3. Tractaments aplicats als cardiomiòcits H9c2

Compost	Concentració	Temps	Vehicle
<i>Experiment amb agonistes i antagonistes dels receptors d'estrògens</i>			
Estradiol (E ₂)	10 nM	24h	Etanol
PPT, agonista d'ER α	1 μ M	24h	DMSO
MPP, antagonista d'ER α	1 μ M	24h	DMSO
DPN, agonista d'ER β	1 μ M	24h	DMSO
PHTPP, antagonista d'ER β	1 μ M	24h	Etanol
G-1, agonista de GPER	1 μ M	24h	DMSO
G15, antagonista de GPER	1 μ M	24h	DMSO
<i>Experiments de lipotoxicitat i inflamació</i>			
Palmitat (PA)	100 μ M	20h	BSA i NaOH
Estradiol (E ₂)	100 nM	20h	Etanol
Adiponectina	1,25 μ g/ μ l	15 min	PBS amb BSA 0.1%
A769662, activador d'AMPK	10 μ M	20h	DMSO
Compost c, inhibidor d'AMPK	1 μ M	20h	H ₂ O

Preparació del palmitat

Els complexos de palmitat (PA) amb BSA es varen preparar mitjançant una reacció de saponificació. Així, inicialment es va preparar una solució d'àcid

palmític 50 mM (Sigma Aldrich) en NaOH 0.1 N. Per a què l'àcid palmític es dissolgués va caldre un incubació a 70°C durant 15 minuts. D'aquesta manera forma PA sòdic per reacció de saponificació, una molècula anfipàtica que conté una coa hidrocarbonada apolar i un extrem COONa que es pot ionitzar i interaccionar amb l'aigua.



A continuació, es va dissoldre el PA en DMEM que contenia BSA lliure d'àcids grassos durant 30 minuts a 50°C en agitació. La concentració final de PA va ser 5 mM, i el rati molar PA:BSA era 3:1. Paral·lelament es va preparar una solució de vehicle que contenia NaOH i BSA però no PA. Les solucions de PA i de vehicle es varen filtrar i emmagatzemar a -20°C fins el seu ús.

Durant la posta a punt del mètode de preparació del PA es va dur a terme un control del pH, el qual era susceptible d'incrementar-se degut a l'elevada presència de NaOH. A la concentració final de PA emprada per tractar les cèl·lules (0.1 mM), la qual suposava una concentració de NaOH final de 0.2 mM, el pH no va variar.

3.2.4. Recollides de mostres per a Western blot i per obtenció del RNA

Per a l'obtenció d'un lisat cel·lular per realitzar Western blot es va fer un rentat amb PBS per eliminar restes de medi i s'afegiren 200 µl de tampó de lisi fred tipus RIPA. La composició del tampó està indicada a la taula 4. La lisi cel·lular va ser facilitada per mitjà de *scrappers* i es va transferir el lisat cel·lular a tubs de 1.5 ml. Seguidament es va fer una centrifugació a 14000g durant 10 min a 4°C i es descartà el precipitat.

Taula 4. Composició del tampó RIPA

Compost	Funció
Tris 50 mM pH 7.5	Permet el manteniment del pH del medi
Tritó X-100 0.1%	
Deoxicolat sòdic 0.5%	Combinació de detergents per dissociar les membranes cel·lulars
SDS 0.1%	
EDTA 1 mM	Agent quelant d'ions de magnesi i inhibidor de proteases
NaCl 150 mM	Manté la força iònica del medi
PMSF 1 mM	Inhibidor de serina proteases
Pepstatina 10 µM	Inhibidor d'aspartat proteases
Leupeptina 10 µM	Inhibidor de cisteïna i serina proteases
NaF 1 mM	Inhibidor de serina i treonina fosfatases
Na ₃ VO ₄ 1 mM	Inhibidor de tirosina fosfatases

L'extracció del RNA es dugué a terme amb el *TriPure Isolation Reagent*[®] (Roche Diagnostics) seguint les instruccions del fabricant. S'emprà 1 ml de reactiu per a cada pouet de plaques p6. El procediment va ser el mateix que en l'extracció de RNA a partir de múscul cardíac (apartat 3.1.6.).

3.2.5. Anàlisi de la viabilitat cel·lular

La mort cel·lular degut a la citotoxicitat dels tractaments emprats va ser analitzada mitjançant la tècnica del cristall violeta (Nagamine et al., 2009), un compost que s'uneix al material genètic de les cèl·lules i dona una coloració violeta. Les cèl·lules es varen sembrar en plaques d'espectrofotometria de 96 pouets, es diferenciaren i es realitzaren els tractaments pertinents. Aleshores, sense eliminar el medi, es varen afegir 20 µl de cristall violeta 0.5% (p/v) en àcid acètic 30% i es va incubar durant 10 minuts. L'àcid acètic permet la fixació de les cèl·lules i el cristall violeta s'uneix al DNA. A continuació es va eliminar el medi i es varen realitzar varis rentats amb aigua destil·lada. Finalment es va solubilitzar el cristall violeta amb metanol i es va llegir a l'absorbància a 570 nm.

3.3. Estudis amb cèl·lules endotelials de vena de cordó umbilical humà

3.3.1. Metodologia general del cultiu de HUVECs

El doctorant va efectuar una estada pre-doctoral de tres mesos al *Institute of Cardiovascular and Medical Sciences*, de la Universitat de Glasgow (Escòcia), on va treballar amb cèl·lules de vena de cordó umbilical humà (HUVECs). Es tracta d'un cultiu primari de cèl·lules endotelials que es pot subcultivar fins a 7-8 vegades sense perdre les característiques fenotípiques, de manera que suposa una eina molt adient per a l'estudi de la patologia endotelial.

Les HUVECs varen créixer a 37°C amb un 5% de CO₂ amb un medi específic per aquest tipus cel·lular (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) suplementat amb una mescla de vitamines i factors de creixement. Pel manteniment del cultiu s'empraren flascons de 75 cm², mentre que pels tractaments s'empraren plaques p6. La metodologia general de treball amb HUVECs (descongelació, subcultiu, etc.) va ser molt similar a la seguida amb els cardiomiòcits H9c2 (apartat 3.2.2). La principal diferència radica en que les HUVECs no requereixen processos de diferenciació, de manera que els tractaments es varen realitzar amb una confluència absoluta.

3.3.2. Transfecció mitjançant adenovirus

Els adenovirus són una gran família de virus amb un DNA bicatenari que poden causar malalties lleus del tracte respiratori. Alhora, suposen una gran eina de transferència gènica a cèl·lules de mamífer ja que tenen unes elevades taxes de creixement i d'infectivitat. Els adenovirus emprats al laboratori manquen d'algun gen necessari per a la propagació vírica. Paral·lelament, s'han desenvolupat línies cel·lulars, com les cèl·lules de ronyó embrionari HEK 293, que expressen la proteïna absent a la partícula vírica, de manera que permeten la propagació i multiplicació dels virus. La titulació o

quantificació de partícules víriques es mesura mitjançant el paràmetre de unitats formadores de placa (ufp), en funció de les unitats visibles d'infecció de HEK 293 a partir d'una sola partícula vírica.

Les HUVECs varen ser transfectades amb adenovirus que sobreexpressaven una forma dominant negativa de la subunitat β de la cinasa de l'inhibidor de NF- κ B (IKK β) (Ad.IKK β .DN). En una prova prèvia, es varen incubar les cèl·lules amb medi lliure de sèrum durant 3 hores i posteriorment s'infectaren amb 10 i 60 ufp/ml durant 24h. Es varen recollir les cèl·lules i s'analitzaren els nivells d'IKK β , observant-se una major expressió a mesura que augmentava la dosi de transfecció (fig. 10), de manera que va disminuir la fosforilació i degradació d'I κ B ja que aquestes són provocades per la IKK (Liu et al., 2012). Així, es va escollir una dosi de 60 ufp/ml per a futurs experiments.

Paral·lelament, es va fer una infecció amb la mateixa dosi de virus que sobreexpressaven la proteïna verda fluorescent (GFP) i es va observar al microscopi de fluorescència la presència del color verd a les cèl·lules per tenir una mesura del percentatge de cèl·lules que havien estat infectades. Emprant 60 ufp/ml el percentatge de cèl·lules infectades va ser del 100%.

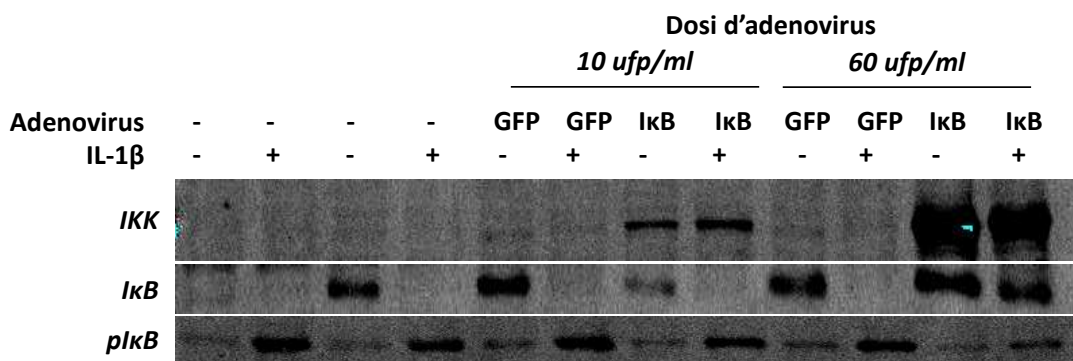


Figura 10. Posta a punt de la metodologia per la transfecció amb adenovirus.

3.3.3. Tractaments

Abans del tractament, es varen incubar les cèl·lules dues hores amb medi específic sense suplement vitamínic ni factors de creixement per evitar

interferències amb les vies cel·lulars estudiades. Es realitzaren tres experiments independents (n=3), excepte per a l'estudi de la translocació nuclear del NF- κ B, que foren dos experiments realitzats per duplicat (n=4).

L'AMPK va ser activada mitjançant A769662 100 μ M durant 30 minuts i posteriorment s'incubà amb IL-1 β 10 ng/ml a diferents temps segons l'estudi. Per a la inhibició de p38, les cèl·lules es tractaren amb l'inhibidor SB202190 100 μ M durant 30 minuts i posteriorment s'incubà amb IL-1 β 10 ng/ml durant 15 minuts. Per inhibir la IKK, les cèl·lules s'infectaren amb adenovirus Ad.IKK β .DN (secció 3.3.2) durant 24 hores i es varen estimular amb IL-1 β 10 ng/ml durant 15 minuts. Un cop acabats els tractaments i, segons l'estudi, es varen recollir les cèl·lules amb tampó RIPA o varen ser fixades per realitzar una tinció immunofluorescent.

3.3.4. Recollida de cèl·lules

Una vegada realitzats els experiments, s'aspirà el medi i es varen recollir les cèl·lules mitjançant *scrappers* amb 150 μ l de tampó de lisi (taula 5). Els lisats cel·lulars varen ser centrifugats a 14000g durant 5 minuts a 4°C i s'emmagatzemaren els sobrenedants a -20°C.

Taula 5. Composició del tampó de lisi per a les cèl·lules HUVECs

Compost	Funció
Tris 50 mM pH 7.4	Contribueix al manteniment del pH del medi
Na ₄ P ₂ O ₇ 1 mM	Contribueix al manteniment del pH del medi
Triton X-100 1%	Ruptura de les membranes cel·lulars
EDTA 1 mM	Agent quelant d'ions de magnesi i inhibidor de proteases
EGTA 1 mM	Agent quelant d'ions de calci i inhibidor de proteases
Manitol 250 mM	Lisi cel·lular i ruptura de les membranes per xoc osmòtic
Ditiotreitol 1 mM	Redueix el dany oxidatiu
Inhibidor de tripsina 5 μ g/ml	Inhibidor de serina proteases
Benzamidina 100 μ M	Inhibidor de serina proteases
NaF 1 mM	Inhibidor de serina i treonina fosfatases
Na ₃ VO ₄ 1 mM	Inhibidor de tirosina fosfatases

3.4. Metodologia general

3.4.1. Mesura del consum d'oxigen a miofibres permeabilitzades

El consum d'oxigen es va mesurar a les miofibres cardíques permeabilitzades mitjançant un elèctrode d'oxigen tipus Clark (Oxygraph; Hansatech, Norfolk, Regne Unit). Es tracta d'un detector d'oxigen polarogràfic que conté un ànode de plata, un càtode de platí, una membrana permeable a l'oxigen i un electròlit de KCl. L'oxigen difon a través de la membrana permeable cap al càtode i, sota un voltatge polaritzant, és oxidat a OH^- amb una reducció paral·lela de l'aigua a H_2O_2 . A l'ànode, en canvi, la plata reacciona amb el clor i dona lloc a clorur de plata. Aquestes reaccions generen una corrent que és la base de la mesura ja que el flux de corrent és proporcional al consum d'oxigen durant el procés.

Aproximadament 2 mg de fibres cardíques dissoltes amb 500 μl de solució B suplementada amb BSA (veure apartat 3.1.5) es varen incubar a 37°C a la cambra de l'elèctrode de Clark. Es varen dur a terme dues determinacions del consum d'oxigen per a cada animal, una amb glutamat/malat (5/2.5 mM) i una amb palmitoilcarnitina (2.5 mM). El glutamat és un aminoàcid que pot produir un intermediari del cicle de Krebs, l'alfa-cetoglutarat, mitjançant l'enzim glutamat deshidrogenasa, en una reacció on es forma NADH. El malat és una molècula que mitjançant la llançadora de malat/aspartat (molt abundant al cor) és capaç d'entrar al mitocondri on s'oxida donant lloc a oxalacetat i NADH. Així, emprar glutamat/malat suposa una elevada formació de NADH i, per tant, una gran transferència d'electrons al complex I, de manera que la cadena respiratòria funciona principalment a través d'aquest complex. Per la seva banda, la palmitoilcarnitina dóna lloc a través de la β -oxidació a NADH i a FADH_2 de manera directa o a través del cicle de Krebs, de forma que la cadena respiratòria funciona pel complex I i, en menor mesura, pel complex II.

3.4.2. Mesura de la producció de H₂O₂ a miofibres permeabilitzades

La producció de peròxid d'hidrogen va ser determinada a les miofibres cardíques permeabilitzades mitjançant el reactiu de l'Amplex Red® (10-acetil-3,7-dihidrofenoazina) (Invitrogen). Aquesta molècula reacciona amb el H₂O₂ i, mitjançant una reacció catalitzada per la peroxidasa, es produeix resorufina, un compost vermellós fluorescent detectable.

Es va preparar tampó de respiració (K-MES 100 mM, KCl 35 mM, EGTA 1 mM, MgCl₂ 3 mM, K₂HPO₄ 10 mM, pH 7.1) suplementat amb BSA 5 mg/ml, Amplex Red 0.1 mM i peroxidasa de rave (HRP) 0.2 U/ml. A continuació, es varen pipetejar 50 µl de tampó de respiració i 1 mg de fibres permeabilitzades a cada pouet. Seguidament s'afegiren 50 µl de solució de treball i s'incuba a 37°C durant 5 minuts al propi fluorímetre. Finalment s'afegiren 5 µl de substrat per generar el peròxid d'hidrogen i es llegí amb un $\lambda_{\text{excitació}}$ de 530 nm i una $\lambda_{\text{emissió}}$ de 590 nm. Els substrats que s'afegiren varen ser glutamat/malat (5/2.5 mM) i palmitoilcarnitina (2.5 mM) i, en el cas del patró, glucosa 13.3 mM. En paral·lel a les mostres, es va fer un patró amb glucosa oxidasa, la qual produeix H₂O₂ a partir de glucosa. En les condicions de treball, 0.8 µU/ml de glucosa oxidasa produeixen 1.52 pmol/l de H₂O₂ per minut. D'aquesta manera, s'elaborà un patró que va comprendre de 4 a 24 µU/ml de glucosa oxidasa i es va obtenir una corba patró que representava la producció de H₂O₂ per minut respecte la mesura fluorimètrica, a partir de la qual es va calcular la producció de peròxids de les mostres.

3.4.3. Determinació de la concentració de proteïnes

3.4.3.1. Mètode de Bradford

Es tracta d'un mètode per a la detecció de proteïnes basat en la utilització del blau de Coomassie (Bradford, 1976), un colorant hidrofòbic que en condicions àcides té un color vermell-marronós, però quan interacciona amb

l'entorn hidrofòbic de l'interior d'una proteïna s'origina un color blau que es pot mesurar espectroscòpicament. Suposa un mètode ràpid i econòmic per mesurar la concentració proteica d'una mostra. En aquesta tesi, el mètode de Bradford va ser emprat per mesurar la concentració proteica dels homogenats de múscul cardíac i de les mostres de cor digerides amb NaOH.

Per preparar 1 litre de reactiu de Bradford es varen diluir 100 mg de blau de Coomassie amb 50 ml d'etanol 96%. A continuació s'afegiren 600 ml d'aigua bidestil·lada i 100 ml d'àcid fosfòric 85%, i s'enrasà amb aigua destil·lada. El mètode de Bradford requereix un patró de proteïnes de concentració coneguda. Es va emprar un patró de BSA amb un rang de concentracions de 100 a 500 µg/ml.

A una placa de 96 pouets s'introduïrien 10 µl de mostra convenientment diluïda o 10 µl de cada solució del patró, i, seguidament, 290 µl de reactiu de Bradford. A continuació s'agità la placa i es feu una lectura a 540 nm.

3.4.3.2. Mètode de l'àcid bicinoninic (BCA)

El mètode de Bradford depèn de la interacció inespecífica entre un colorant hidrofòbic i les proteïnes, per la qual cosa és sensible a detergents. Per als lisats cel·lulars dels cardiomiòcits H9c2, degut a l'elevada concentració de detergents al tampó RIPA (veure secció 3.2.4), es va determinar el contingut proteic amb el mètode del BCA. Aquest mètode es basa en que les proteïnes redueixen ions cúprics a ions cuprosos en condicions alcalines; posteriorment, els ions cuprosos reaccionen amb el BCA, que passa de tenir un color verdós a un color rosat la intensitat del qual és proporcional a la quantitat de proteïna de la mostra. Es va un kit comercial del BCA (Thermofisher Scientific), el qual requereix un patró de BSA que comprèn un rang de concentracions de 25 a 2000 µg/ml. Es seguiren les indicacions del fabricant i es va llegir l'absorbància a 562 nm.

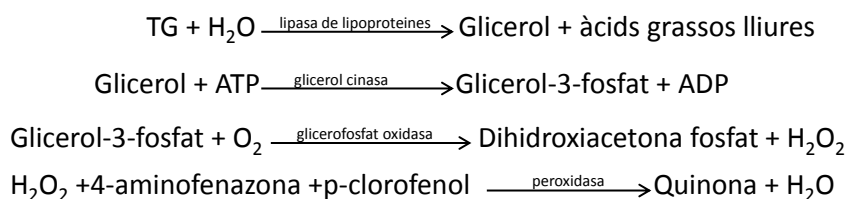
3.4.4. Determinació de la concentració de DNA

La concentració de DNA a les mostres de cor digerides amb NaOH 0.5 N es va determinar mitjançant el mètode de l'àcid 3,5-diaminobenzoic (DABA) (Thomas and Farquhar, 1978). Aquest mètode es basa en que el DABA pot reaccionar amb els grups aldehids de les desoxiriboses del DNA i originar un producte detectable fluorimètricament.

Inicialment s'han de neutralitzar les mostres amb un volum equivalent de HCl 0.5 N. Per això, es varen pipetejar 3 µl de mostra, 97 µl de NaOH 0.5 N i 100 µl de HCl 0.5 N. Seguidament es varen afegir 50 µl de DABA 1.2 M i s'incubà a 60°C durant 50 minuts. Transcorregut aquest temps, les mostres es refredaren ràpidament introduint-les en gel i es va afegir 1 ml de HCl 1 M per estabilitzar la reacció. Finalment, es varen agitar les mostres i es transferiren a pouets de plaques de fluorimetria. La lectura es va fer amb una $\lambda_{\text{excitació}}$ de 360 nm i una $\lambda_{\text{emissió}}$ de 528 nm. Paral·lelament es va preparar un patró de DNA obtingut d'esperma d'areng (Sigma Aldrich) amb un rang de concentracions de 4.5 a 30 ng/µl.

3.4.5. Determinació dels nivells de triglicèrids cardíacs

El contingut de TG als homogenats de múscul cardíac va ser determinat mitjançant un kit comercial (Spinreact, Girona, Espanya). Aquest kit es basa en una sèrie de reaccions enzimàtiques a partir de les quals s'origina una quinona que té una coloració vermellosa la intensitat de la qual és proporcional a la quantitat inicial de TG (Fossati and Prencipe, 1982).



En cubetes de 1 cm de pas de llum es varen pipetejar 10 μ l d'homogenat de múscul cardíac i 1 ml de reactiu d'assaig, que conté els components necessaris per a què es donin les reaccions anteriors. A continuació s'incubà durant 5 minuts a 37°C i es llegí l'absorbància a 505 nm. Es va emprar un calibrador proporcionat pel propi kit amb una concentració de 200 mg TG/dl. Així, es va obtenir la concentració de TG de les mostres referenciant l'absorbància d'aquestes respecte l'absorbància i la concentració del calibrador.

3.4.6. Anàlisi de la capacitat antioxidant total no enzimàtica (TAC)

La TAC va ser mesurada a mostres d'homogenat cardíac mitjançant un kit comercial (Biovision). El kit es basa en la reducció del Cu^{2+} a Cu^+ per part de molècules antioxidants petites i proteïnes. L'ió cuprós és quelat per una sonda colorimètrica donant lloc a un producte amb una absorbància màxima a 570 nm, la qual és proporcional a la capacitat antioxidant màxima de la mostra. S'emprà un estàndard de trolox per expressar la capacitat antioxidant en forma d'equivalents de trolox.

3.4.7. Determinació semiquantitativa dels nivells de proteïna per Western blot

El Western blot és una tècnica basada en la quantificació relativa dels nivells de proteïnes específiques d'una mostra. El mètode comprèn una separació inicial de les proteïnes mitjançant una electroforesi, una transferència d'aquestes a una membrana i una detecció basada amb l'ús d'anticossos específics.

Preparació de les mostres

És important que les mostres estiguin ben lisades per a que les proteïnes cel·lulars estiguin solubilitzades i que la concentració de proteïnes estigui ben determinada. Per a dur a terme els Western blot d'aquesta tesi doctoral

s'utilitzaren 30 µg de proteïna d'homogenat de cor i 10 µg de proteïna de lisats cel·lulars de cardiomiòcits H9c2 i HUVECs.

Es va pipetejar el volum adequat de mostra per la quantitat de proteïna a carregar i s'hi afegí tampó de càrrega mantenint una relació 3:1 (mostra:tampó). Els components del tampó de càrrega i la seva concentració final són:

- Tris 0.25 M pH 6.8. És important aquest valor de pH per a la correcta migració de la mostra a l'inici de l'electroforesi.
- Dodecilsulfat sòdic (SDS) 10% (v/v). És un detergent aniònic que interacciona amb el nucli hidrofòbic de les proteïnes provocant la seva desnaturalització. A la concentració emprada, el SDS s'uneix de manera constant a la proteïna a una relació aproximada d'una molècula de SDS per a cada dos aminoàcids. Això provoca que la càrrega de la proteïna quedi emmascarada per la càrrega negativa del SDS que duu unit, la qual serà proporcional a la grandària (pes molecular) de la proteïna. D'aquesta manera el pes molecular serà el factor diferencial de la migració de les proteïnes cap a l'ànode durant l'electroforesi.
- Glicerol 40% (v/v). Permet donar densitat a la mostra, de manera que quan aquesta es deposita al pouet cau al fons facilitant-se la seva càrrega.
- Blau de bromofenol 0.1% (p/v). És un petit colorant que durant l'electroforesi crea el front electroforètic que permet seguir la migració electroforètica de la mostra.
- β-mercaptoetanol (0.025%). Es va preparar al moment del seu ús. Es tracta d'un agent reductor que permet rompre els ponts disulfur que mantenen unides les diferents subunitats d'una proteïna multimèrica.

Abans de carregar les mostres al gel, aquestes varen ser incubades al bany maria durant 5 minuts per tal de desnaturalitzar les proteïnes i facilitar la unió del SDS.

Electroforesis SDS-PAGE

L'electroforesi de proteïnes es duu a terme amb gels de poliacrilamida, els quals estan formats per monòmers d'acrilamida i N,N'-metil bisacrilamida en una relació 29:1. Per a la seva polimerització es va afegir persulfat d'amoni a una concentració final del 0.11%. El persulfat amònic origina radicals lliures SO_4^- en solució, els quals interaccionen amb els monòmers d'acrilamida per a formar polímers linears. La bisacrilamida uneix cadenes d'acrilamida en creixement originant una estructura microscòpica tridimensional. Es va afegir també tetrametilendiamina (TEMED) a una concentració final del 0.001%, el qual actua com a catalitzador d'aquesta reacció de polimerització.

La tècnica d'electroforesis emprada va ser la SDS-PAGE, una tècnica que requereix l'ús de gels en gradient distingint-se un gel superior de concentració o *stacking gel* i un gel inferior de separació o *running gel*. Així, la part inicial del gel conté una concentració inferior d'acrilamida (4.9%) respecte la part final, de manera que s'aconsegueix major resolució en la separació de proteïnes. La concentració d'acrilamida al gel de separació depèn del pes molecular de les proteïnes d'interès; com més baix és el pes molecular més concentrat ha de ser el gel i viceversa. En aquesta tesi es varen emprar concentracions d'acrilamida del 8%, 10% i 12%. Els dos gels contenen també SDS 0.1% i tampó Tris-HCl (0.125 mM pH 6.8 al gel concentrador i 0.375 mM pH 8.8 al separador). A més, les cubetes electroforètiques s'omplen amb tampó d'electroforesis que està format per Tris 25 mM pH 8.3, glicina 192 mM i SDS 0.1% (p/v).

El pH del gel de concentració correspon al punt isoelèctric de la Gly, de manera que la mobilitat electroforètica en aquest gel és elevada pel Cl^- , baixa per la Gly i intermèdia per a les proteïnes. L'elevada mobilitat del Cl^- origina

un gradient de voltatge que accelera la migració de la Gly, de manera que aquesta *empeny* les proteïnes de la mostra cap al Cl⁻ i s'origina una fina banda apilada a la interfície entre el gel concentrador i el separador. Al gel separador el pH és de 8.8, superior al punt isoelectric de la Gly, de manera que aquest aminoàcid està carregat principalment de forma negativa i migra cap a l'ànode a més velocitat que les proteïnes, les quals es desplacen a una velocitat inversament proporcional al seu pes molecular. El voltatge aplicat per a realitzar l'electroforesi va ser de 80 V mentre la mostra es trobava al gel concentrador i 100 V quan estava al gel de separació. El temps total d'electroforesi va ser aproximadament de 2.5 hores.

Electrotransferència i bloqueig

Una vegada les proteïnes estan separades, aquestes es detecten mitjançant anticossos específics. No obstant, aquests anticossos no poden accedir a les proteïnes ubicades al gel, de manera que cal que aquestes siguin transferides a una membrana on hi quedin accessibles. Aquesta transferència es basa en aplicar un camp elèctric de manera que les proteïnes, encara unides al SDS, migren cap a l'ànode.

En aquesta tesi doctoral es va emprar un sistema d'electrotransferència humida amb membranes de nitrocel·lulosa. Aquest sistema es basa en col·locar junts el gel i la membrana, de manera que el gel quedi més proper al càtode i la membrana a l'ànode. Entre ells i els elèctrodes es col·loquen papers de filtre i esponges banyats en tampó de transferència (Tris 25 mM pH 8.3, Gly 192 mM, metanol 20%) a fi de que la unió entre gel i membrana sigui compacta i no quedin espais buits que impedeixin la correcta transferència de proteïnes. La transferència es dur a terme en fred a 100V durant 90 minuts.

Un cop realitzada la transferència es pot realitzar una tinció amb vermell de Ponceau, un colorant que s'uneix a totes les proteïnes de la membrana i dóna una imatge del perfil de l'eficiència de la transferència. A més, aquesta tinció es

pot emprar com a paràmetre de referència de la quantitat total de proteïna de la mostra, tipus *housekeeping*.

A continuació, cal bloquejar les zones de la membrana a les quals no s'hi ha unit proteïna ja que sinó els anticossos s'hi podran unir i s'obtidrien falsos positius. Pel bloqueig es va emprar tampó fosfat salí (PBS, Na₂HPO₄ 78.1 mM, KH₂PO₄ 17.6 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,68 mM, pH 7.4) suplementat amb Tween-20 1 g/l (PBS-T) i amb llet en pols desnatada al 5%. Per a la detecció de proteïnes fosforilades es va emprar BSA al 5% en PBS-T ja que la llet pot tenir fosfatases que podrien alterar la detecció d'aquestes proteïnes.

Detecció de les proteïnes específiques

Una vegada bloquejada la membrana, aquesta es va incubar amb l'anticòs específic per a la proteïna diana a 4°C durant tota la nit. Els anticossos emprats per aquesta tesi doctoral es troben indicats a la taula 6. Aquests anticossos es varen preparar a la concentració desitjada en tampó PBS-T amb BSA 0.5% i acida sòdica 0.05%. A continuació es varen fer rentats amb PBS-T per eliminar restes d'anticòs primari i s'incubà amb anticòs secundari durant una hora a temperatura ambient. L'anticòs secundari es va preparar en tampó PBS-T amb un 1% (p/v) de llet en pols a una dilució variable entre 1/10000 i 1/60000.

La detecció de les bandes es va fer amb un kit comercial (Immunostar Western Chemiluminescence Kit, Biorad). Aquest sistema es basa en què l'anticòs secundari té unida una molècula de peroxidasa de rave, de manera que en presència de peròxid d'hidrogen, el luminol és oxidat i s'emet llum per quimioluminescència. Per a la detecció es va usar el captador Chemidoc XRS (Biorad) i el programa associat Quantity one.

El sistema de revelat realitzat al *Institute of Cardiovascular and Medical Sciences* de la Universitat de Glasgow va ser diferent ja que els anticossos secundaris

duien units un fluoròfor. Aquest sistema permet l'ús simultani de varis anticossos primaris obtinguts a partir de diferents animals que posteriorment són reconeguts per anticossos secundaris units a diferents fluoròfors.

Taula 6. Anticossos emprats per realitzar els Western blots

Proteïna	Casa comercial	Pes molecular (kDa)	Dilució
pACC	Cell Signalling	280	1:1000
AdipoR1	Abcam	43	1:500
pAkt	Cell Signalling	60	1:1000
Akt	Cell Signalling	60	1:1000
pAMPK	Santa Cruz	63	1:500
AMPK	Cell Signalling	63	1:200
APPL1	Cell Signalling	82	1:1000
COX 4	MitoScience	16	1:1000
DNPH	Chemicon International	-	1:2000
ER α	Santa Cruz	66	1:200
ER β	Santa Cruz	56	1:100
pERK 1/2	Cell Signalling	42-44	1:1000
ERK 1/2	Cell Signalling	42-44	1:1000
GAPDH	Santa Cruz	37	1:1000
GPER	Santa Cruz	38	1:1000
pI κ B	Cell Signalling	39	1:1000
I κ B	Cell Signalling	39	1:1000
IKK	Cell Signalling	85	1:1000
pJNK 1/2	Cell Signalling	46-54	1:1000
JNK 1/2	Cell Signalling	46-54	1:1000
LKB1	Cell Signalling	54	1:1000
p p38	Cell Signalling	38	1:1000
p38	Cell Signalling	38	1:1000
PGC-1 α	Millipore	90	1:500
PRX3	Santa Cruz	26	1:500
Mn SOD	Calbiochem	25	1:500
TAK1	Santa Cruz	79	1:200
TFAM	Donació del Dr. H. Inagaki	25	1:1000
P-Thr totals	Abcam	-	1:200
T-cad	Millipore	105-130	1:200
UCP2	Santa Cruz	35	1:1000
UCP3	Santa Cruz	33	1:1000
4HNE	Alpha diagnòstics	-	1:1000

3.4.8. Quantificació dels grups carbonils a proteïnes

Els ROS poden reaccionar directament amb les proteïnes i produir modificacions covalents, donant lloc a oxidació proteica. Una de les modificacions que tenen lloc és la formació de grups carbonils, especialment degut a la interacció del radical hidroxil amb la cadena lateral d'aminoàcids de Pro, Arg, Lys i Thr. Aquests grups carbonils són químicament estables i la seva quantificació és indicadora del dany oxidatiu en proteïnes. La detecció dels grups carbonils es basa en la seva reacció amb 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNP) per formar 2,4-dinitrofenilhidrazona (DNPH), un compost que pot ser reconegut per un anticòs específic (Irazusta et al., 2010).

A les mostres d'homogenats de múscul cardíac procedents de l'experiment amb rates ovariectomitzades els grups carbonils varen ser quantificats mitjançant un sistema slot-blot. Inicialment es va derivatitzar la mostra (10 µg de proteïna) amb un kit comercial (Oxyblot Protein Oxidation Detection Kit, Chemicon International, Temecula, EUA) seguint les instruccions del fabricant. Aquesta derivatització es basa en una incubació inicial de la mostra amb DNP i una posterior neutralització. A continuació es varen pipetejar les mostres derivatitzades als pouets del sistema slot-blot i es transferiren a una membrana de nitrocel·lulosa. En canvi, per a mesurar els grups carbonils del homogenats de l'experiment amb rates alimentades amb una dieta hiperlipídica es va emprar un altre kit comercial (Oxiselect Protein Carbonyl Immunoblot Kit, Cell Biolabs Inc., San Diego, EUA). En aquest cas, inicialment es duu a terme una electroforesis i una transferència a la membrana de nitrocel·lulosa, i posteriorment es derivatitza la mostra. En ambdós casos, una vegada la mostra estigué derivatitzada i transferida a la membrana, aquesta va ser bloquejada i s'incubà amb un anticòs específic envers el DNPH (veure taula 6).

3.4.9. Determinació de la peroxidació lipídica

En condicions d'estrès oxidatiu els ROS poden interaccionar amb els àcids grassos, especialment els poliinsaturats, de forma que la seva cadena hidrocarbonada pot donar lloc a aldehyds electròfils reactius, entre els quals destaca el 4-hidroxinonenal (4HNE) (Esterbauer et al., 1991), el qual pot unir-se a les proteïnes i formar complexos estables que comprometen l'estructura i la funció de les proteïnes. La tècnica emprada per a mesurar els nivells de peroxidació lipídica va ser un Western blot emprant un anticòs envers el 4HNE (veure taula 6).

3.4.10. Determinació de l'expressió gènica

3.4.10.1. Retrotranscripció

La retrotranscripció és una reacció catalitzada per la retrotranscriptasa mitjançant la qual a partir d'una molècula de RNA s'obté la molècula complementària de DNA (cDNA). En aquesta tesi doctoral es va retrotranscriure el RNA extret a partir de mostres de miocardi i de cardiomiòcits H9c2 mitjançant el Tripure® (veure secció 3.1.6). El procediment va ser igual per ambdós tipus de mostres.

Es va dissoldre 1 µg de RNA amb 5 µl d'aigua lliure de RNAses i es va desnaturalitzar a 90°C durant 1 minut. A continuació s'afegiren 5 µl de mescla de retrotranscripció, la qual contenia (concentracions finals): Tris-HCl 10 mM pH 9, KCl 50 mM, Tritó X-100 0.1%, MgCl₂ 2.5mM, hexàmers aleatoris 2.5 µM, 500 µM de cada un dels dNTPs, 1 U/µl d'inhibidor de RNAses i 1.5 U/µl de transcriptasa inversa MuLV. La retrotranscripció es va dur a terme al termociclador GeneAmp 9700 (Applied Biosystems, Lincoln, EUA) a 42°C durant 60 minuts. A continuació es va desnaturalitzar la mostra a 95°C durant 5 minuts i es va refredar a 4°C. El cDNA resultant es va diluir 1/10 amb aigua

lliure d'ARNases i es va guardar a 4°C per un ús immediat o a -20°C a llarg termini.

3.4.10.2. PCR a temps real

La PCR a temps real és una variant de la PCR convencional que permet amplificar i quantificar simultàniament el producte d'amplificació. Empra els components convencionals de la PCR (tampó, DNA mostra, encebadors, dNTPs, Mg²⁺ i DNA polimerasa) i, a la vegada, s'incorpora una sonda que permet la detecció. En aquesta tesi es va fer servir el SYBR Green I, un agent intercalant que quan s'introdueix a la doble hèlix de DNA incrementa la seva emissió fluorescent.

La PCR a temps real es va realitzar a partir de 2.5 µl de mostra de cDNA. El medi de reacció contenia 3.74 µM de cada un dels dos encebadors i 5 µl de SYBR Green Master (Roche Diagnostics), el qual duu incorporat la resta de components de la reacció. La PCR a temps real es va dur a terme en termociclador LightCycler® 480 System II (Roche Diagnostics). El programa d'amplificació es basa en una desnaturalització inicial del DNA (95°C, 10 segons), seguit per 40-45 cicles que consisteixen en una desnaturalització (94°C, 2 minuts), alineament (temperatura depenent dels encebadors, 10 segons), extensió (72°C, 12 segons) i un pas de captació de la fluorescència. Les condicions emprades per a l'amplificació de cada parell d'encebadors estan detallades a la taula 7.

Per a la determinació dels nivells de mtDNA, es varen amplificar 5 ng de DNA obtingut a partir de l'extracció amb Tripure® (veure secció 3.1.7). S'empraren un parell d'encebadors per un gen mitocondrial (subunitat 4 de la NADH deshidrogenasa) i un per un gen nuclear (rRNA 18S).

Durant els primers cicles la fluorescència que s'emet és basal. No obstant, a partir d'un cert llindar de fluorescència, aquesta inicia un creixement

exponencial. Es defineix el *crossing point* (C_p) com el cicle d'amplificació on la fluorescència sobrepassa aquest llindar. El C_p és el valor que s'empra per establir el càlcul relatiu de l'expressió d'un gen. Com més baix és el C_p , és a dir, com menys cicles són necessaris per assolir uns certs nivells de fluorescència, major DNA específic de partida conté la mostra, és a dir, major és l'expressió del gen.

Taula 7. Seqüències i condicions emprades per a l'amplificació

Gen	Encebador directe (5'→3') Encebador revers (5'→3')	Temperatura d'alineament (°C)	Longitud de l'amplificat (pb)	T _m (°C)
mtDNA	TACACGATGAGGCAACCAAA GGTAGGGGGTGTGTTGTGAG	63	162	81.1
rRNA 18S	GGACACGGACAGGATTGACA ACCCACGGAATCGAGAAAGA	59	90	84.7
Actina	GAGACCTTCAACACCCC GTGGTGGTGAAGCTGTAGCC	56	219	87.4
CD36	CTCACACAACCTCAGATACTGCTG TCCAAACACAGCCAGGACAG	60	181	84.1
COX 1	GCTTTTGACTGCTTCCTCCA AATCTACGGATACCCAGCA	60	133	81.3
CPT1	ATGACGGGGTCCCATAAGGA GAAAGCACCTCGTCCAGGAA	60	179	82.5
MCAD	AACAGAGCAGGAAGGCATCA TCCTCTCTGGCAAACCTCCG	60	195	84.6
PDK4	AATGTGGTCCCTACGATGGC TCCCAATGTGGCTTGGGTTT	60	194	80.0
Perilipina V	CACTGTGCTGAGGCGCT ACGCACAAAGTAGCCCTGTT	60	181	88.5
PGC-1 α	ATCTACTGCCTGGGGACCTT ATGTGTGCGCCTTCTTGCTCT	60	179	82.5
PPAR α	TGCCITCCCTGTGAACTGAC GCTTCAAGTGGGGAGAGAGG	60	151	85.6

3.4.10.3. Anàlisi de l'eficiència i càlcul de l'expressió gènica

L'eficiència de la reacció de la PCR a temps real depèn del parell d'encebadors emprat i del tipus de mostra de partida. L'eficiència pot tenir un valor màxim de dos si a cada cicle d'amplificació es duplica el nombre de còpies del DNA

diana. És molt important conèixer el valor de l'eficiència a l'hora de calcular l'expressió relativa del gen d'interès ja que l'increment de la fluorescència és exponencial i el nombre de còpies pot ser subestimat o sobreestimat si no s'empra aquest paràmetre. Per determinar l'eficiència es varen recollir els amplificats una vegada la PCR havia finalitzat, es va fer un banc de dilucions de 10^{-3} a 10^{-9} i es va tornar a fer una PCR. Representant el logaritme de la concentració relativa enfront el C_p s'obté una recta la pendent de la qual és l'eficiència.

A l'hora de fer el càlcul de l'expressió gènica es varen tenir en compte els C_p del gen diana i del gen de referència (actina) de cada una de les mostres, i els valors de l'eficiència d'ambdós gens. Els càlculs es realitzaren amb el programa Genex Standard Software (MultiDAnalises, Suècia).

3.4.10.4. Confirmació de l'especificitat de l'amplificació

Al final del programa d'amplificació es va determinar la temperatura de fusió (T_m) dels amplificats. La T_m és la temperatura a la qual la meitat de les molècules de DNA estan desnaturalitzades i depèn, principalment, del contingut en G+C i de la longitud de l'amplificat, de manera que és molt característica de l'amplificat. La presència de més de dues T_m diferents implica que s'han amplificat inespecificitats i, per tant, el valor de C_p obtingut és erroni.

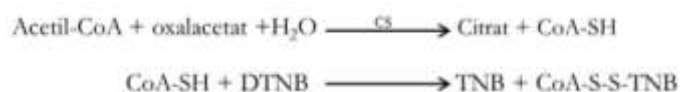
Per corroborar l'especificitat de la reacció, durant la posta a punt de cada gen es va dur a terme una electroforesi dels amplificats en un gel d'agarosa al 1.5%. Per a fer-ho es varen pesar 0.45 g d'agarosa (Pronadisa, Barcelona, Espanya) en 30 ml de tampó Tris-borat-EDTA i es varen afegir 2 μ l de bromur d'etidi 1%, un agent intercalant que permetrà visualitzar l'ADN sota llum ultraviolada. A continuació es va encalenticar la mescla i es va abocar sobre un suport per a gels d'agarosa. Un cop solidificat, es varen afegir 2,5 μ l d'una mescla de mostres amplificades i un marcador de 50 pb (Invitrogen,

Barcelona, Espanya), i es dugué a terme l'electroforesi a 80 V durant 45 minuts. Finalment es varen visualitzar les bandes de DNA amb el captador Chemidoc XRS (Biorad). La presència de més d'una banda a un carril era indicatiu d'inespecificitat en la reacció de la PCR.

3.4.11. Anàlisi de les activitats enzimàtiques

3.4.11.1. Determinació de l'activitat citrat sintasa

La citrat sintasa (CS) (EC 2.3.3.1) catalitza la primera reacció del cicle de Krebs a la matriu mitocondrial. Els substrats de la reacció són l'acetil-CoA, que prové principalment de la reacció del complex de la piruvat deshidrogenasa o de la β -oxidació d'àcids grassos, i l'àcid oxalacètic, que deriva principalment de la darrera reacció del cicle de Krebs. La detecció de l'activitat CS (Nakano et al., 2005) es basa en la hidròlisi del grup tioèster de l'acetil-CoA que origina un CoA unit a un grup tiol, el CoA-SH. El grup tiol pot reaccionar amb l'àcid 5',5'-ditiobis 2-nitrobenzoic (DTNB) i formar àcid 5-tio 2-nitrobenzoic (TNB). Es pot mesurar l'absorbància d'aquest darrer compost a 412 nm, la qual serà proporcional a l'activitat CS.



Els reactius es preparen en fresc en tampó Tris 0.16M pH 8, excepte l'acetil-CoA que es pot guardar aliquotat a -20°C .

Compost	Concentració mare	Volum per pouet	Concentració final
Tris pH 8	0.16 M	125 μl	0.16 M
DTNB	10 mM	2 μl	88.1 μM
Acetil-CoA	0.25 mM	25 μl	27.5 μM
Tritó X-100	0.8 %	25 μl	0.088 %
Oxalacetat	2.5 mM	25 μl	275 μM
Homogenat a dilució 1/100		25 μl	

Als pouets de plaques p96 s'afegeix la mostra i tots els compostos excepte l'oxalacetat. A continuació, al mateix espectrofotòmetre es fa una incubació a 30°C durant tres minuts i s'afegeix l'oxalacetat. Finalment, es llegeix l'augment d'absorbància a 412 nm degut a la formació de TNB (fig. 11).

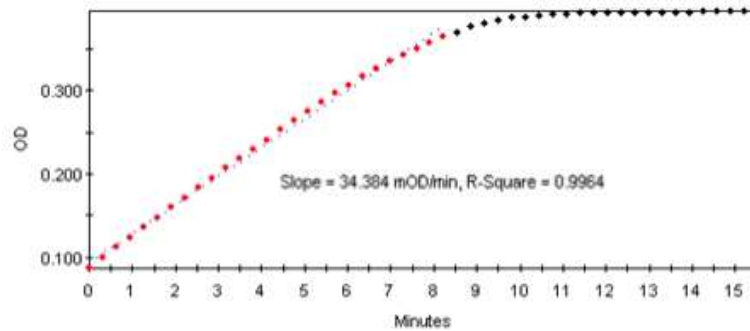


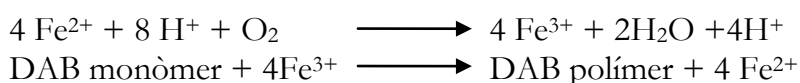
Figura 11. Exemple de corba cinètica que s'observa en la determinació de l'activitat CS.

Aplicant la Llei de Beer-Lambert (ϵ_{412} del TNB= 13.6 mM/cm) es pot convertir la pendent obtinguda en unitats d'activitat CS. Una unitat internacional (UI) de CS suposa la formació de 1 μ mol de citrat per minut.

3.4.11.2. Determinació de l'activitat citocrom c oxidasa

La citocrom *c* oxidasa (COX, EC 1.9.3.1) és un complex enzimàtic integral de la membrana mitocondrial interna d'aproximadament 160 kDa. Suposa el darrer complex de la cadena respiratòria i catalitza la reducció de l'oxigen a aigua a partir de quatre electrons que provenen del citocrom *c* reduït. És l'única reacció irreversible de la cadena respiratòria.

La detecció de l'activitat COX (Chrzanowska-Lightowlers et al., 1993) es fonamenta en que el citocrom *c* reduït es pot tornar a oxidar en una reacció en la qual el tetraclorur de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) polimeritza i pot ser detectat a 450 nm.



Compost	Concentració mare	Volum per pouet	Concentració final
NaH ₂ PO ₄ pH 7	0.1 M	135 µl	
DAB	50 mM	20 µl	5 mM
Catalasa	40 µg/ml	10 µl	2 µg/ml
Citocrom <i>c</i> reduït	800 µM	30 µl	120 µM
Homogenat		5 µl	

A plaques de 96 pouets s'introdueixen tots els components de la reacció, sent el darrer d'ells el citocrom. Aleshores s'agita la placa i es mesura l'augment d'absorbància a 450 nm degut a la polimerització del DAB.

El DAB i la catalasa es preparen en fresc en tampó NaH₂PO₄ minuts abans de la determinació. Per a la preparació del citocrom *c* reduït cal fer una diàlisi prèvia utilitzant tampó NaH₂PO₄ a concentracions de 0.01M i 0.001M. Es bull un sac de diàlisi durant 10 minuts i al seu interior s'introdueixen 50 mg de citocrom *c* oxidat, 500 µl d'àcid ascòrbic 10% i 4.5 ml de tampó fosfat 0.001 M. El sac de diàlisi s'introdueix dins un vas de precipitats que conté NaH₂PO₄ 0.01M i es manté a 4°C en agitació suau durant 24 hores protegit del llum. El citocrom *c* és reduït per l'àcid ascòrbic i es manté dins el sac de diàlisi, mentre que l'àcid ascòrbic escapa del sac. Durant el procés cal canviar el tampó fosfat 0.01M almenys tres vegades per tal d'eliminar l'excés d'àcid ascòrbic. El citocrom *c* reduït es manté a -20°C protegit del llum fins el seu ús.

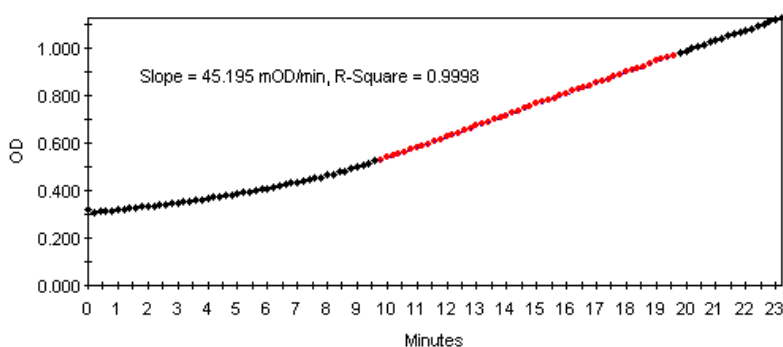
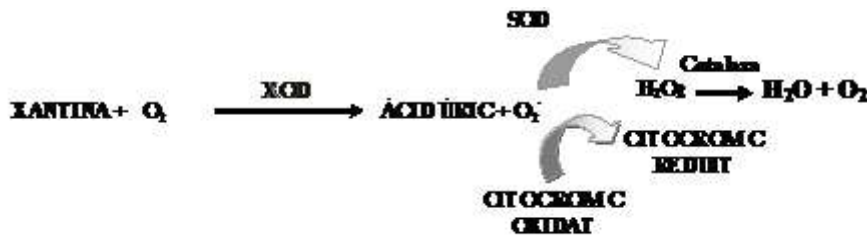


Figura 12. Exemple de corba cinètica que s'observa en la determinació de l'activitat COX.

La determinació es basa en dues reaccions acoblades (fig. 12), de manera que l'activitat màxima pot no donar-se durant els primers minuts. Per calcular l'activitat COX no es pot aplicar la Llei de Beer-Lambert ja que es desconeix el coeficient d'extinció molar del DAB reduït.

3.4.11.3. Determinació de l'activitat superòxid dismutasa

La superòxid dismutasa (SOD) (EC 1.15.1.1) suposa una de les principals línies de defensa antioxidant enzimàtica contra les ROS ja que neutralitza l'anió superòxid ($O_2^{\cdot-}$) que es forma principalment a nivell dels complexos de la cadena respiratòria mitocondrial. La SOD catalitza la dismutació de l'anió superòxid en peròxid d'hidrogen i oxigen.



El mètode de detecció de l'activitat SOD (Quick et al., 2000) es basa en que quan es genera anió superòxid mitjançant la reacció de la xantina oxidasa (XOD), aquest radical pot reduir el citocrom *c*. No obstant, en presència de SOD, l'anió superòxid serà transformat en peròxid d'hidrogen, de manera que disminuirà la reducció del citocrom *c*. Per tant, l'anàlisi de la reducció del citocrom *c*, detectable a 550 nm, serà inversament proporcional a l'activitat SOD de la mostra.

Tots els reactius es preparen en PBS pH 7.4, excepte la xantina que es fa amb NaOH 30 mM.

Compost	Concentració mare	Volum per pouet	Concentració final
PBS pH 7.4		225 μ l	
Citocrom <i>c</i>	1.95 mM	6 μ l	46.8 μ M
XOD	335 mU/ml	9 μ l	12.1 mU/ml
Xantina	10 mM	2.5 μ l	100 μ M
Catalasa	6000 U/ml	2.5 μ l	60 U/ml
Homogenat		5 μ l	

Es prepara una mescla de tots els reactius en funció del nombre de mostres a determinar i s'introdueix a plaques de 96 pouets, juntament amb la mostra. Paral·lelament hi ha un control 1 que no conté mostra i un control 2 que conté SOD (570 U/ml) en lloc de mostra. Finalment es llegeix l'augment d'absorbància a 500 nm degut a la reducció del citocrom *c*.

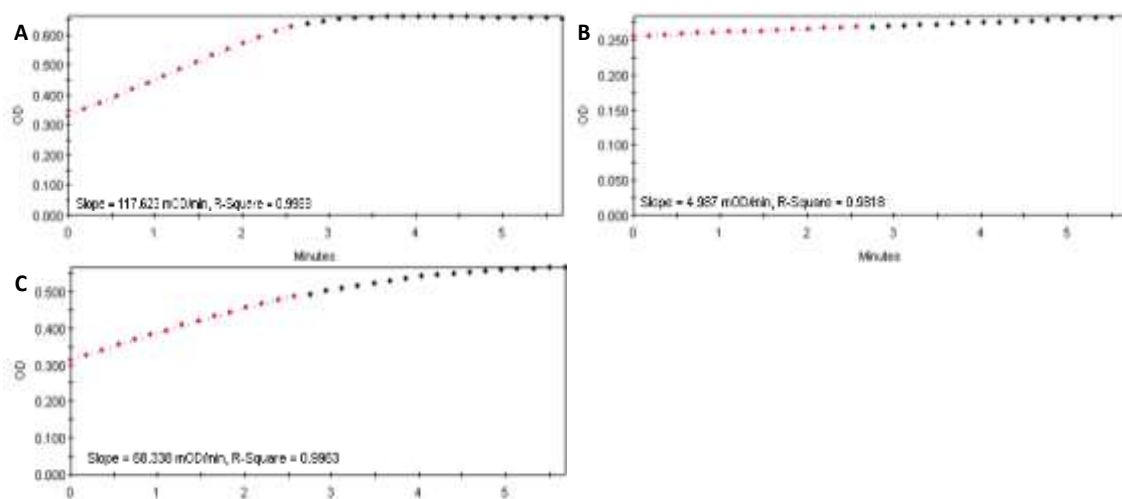


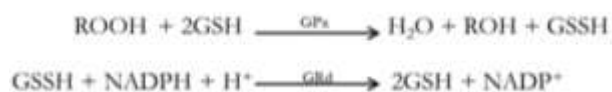
Figura 13. Exemple de corba cinètica per a la determinació de l'activitat SOD.

A la figura 13A es pot veure la màxima reducció del citocrom *c* degut a l'absència de SOD (control 1), mentre que a la figura 13B s'observa que l'elevada concentració de SOD provoca una neutralització de l'anió superòxid i, conseqüentment, una menor reducció del citocrom *c* (control 2). La figura 13C correspon a una mostra d'homogenat de múscul cardíac, amb una reducció del citocrom *c* intermèdia entre les dues anteriors. Per calcular l'activitat SOD no s'empra el control 2, ja que aquest és només un control intern del mètode. La pendent neta de la mostra s'obté de la resta de la

pendent del control 1 i la pendent de la mostra. A continuació s'aplica la llei de Beer-Lambert (ϵ_{550} del citocrom *c* reduït = 21 mM/cm. Una UI d'activitat SOD es defineix com la quantitat d'enzim actiu capaç d'inhibir la reducció del citocrom *c* un 50%.

3.4.11.4. Determinació de l'activitat glutatió peroxidasa

L'enzim glutatió peroxidasa (GPx) (EC 1.8.1.7.) catalitza la reducció del H₂O₂ i peròxids orgànics a H₂O emprant el glutatió reduït (GSH) com a cofactor, de manera que aquest es converteix en glutatió oxidat (GSSG). La determinació de l'activitat GPx (Smith et al., 2001) es basa en que el GSSG que es genera pot tornar-se a reduir a GSH mitjançant la glutatió reductasa (GRd), i en aquesta darrera reacció el NADPH s'oxida a NADP⁺. Es pot mesurar l'oxidació del NADPH mitjançant la disminució de l'absorbància a 340 nm, la qual serà proporcional a l'activitat GPx de la mostra.



Els reactius es preparen en fresc en tampó de reacció (Tris-HCl 50 mM, EDTA 5 mM, pH 7.6), excepte el NADPH que es guarda aliquidat a -20°C.

Compost	Concentració mare	Volum per pouet	Concentració final
Tampó Tris-EDTA		230 µl	
GSH	35 mM	10 µl	1.17 mM
NADPH	7.7 mM	10 µl	0.256 mM
GRd	14 U/ml	10 µl	0,467 mU/ml
Tert-butil hidroperòxid	3 mM	25 µl	250 µM
Homogenat		15 µl	

A plaques de 96 pouets s'introdueixen tots els components de la reacció, excepte el tert-butil hidroperòxid. A continuació es duu a terme una incubació al propi espectrofotòmetre a 37°C durant 3 minuts, s'afegeix el tert-butil

hidroperòxid i es llegeix la disminució de l'absorbància a 340 nm la qual serà proporcional a l'activitat GPx de la mostra.

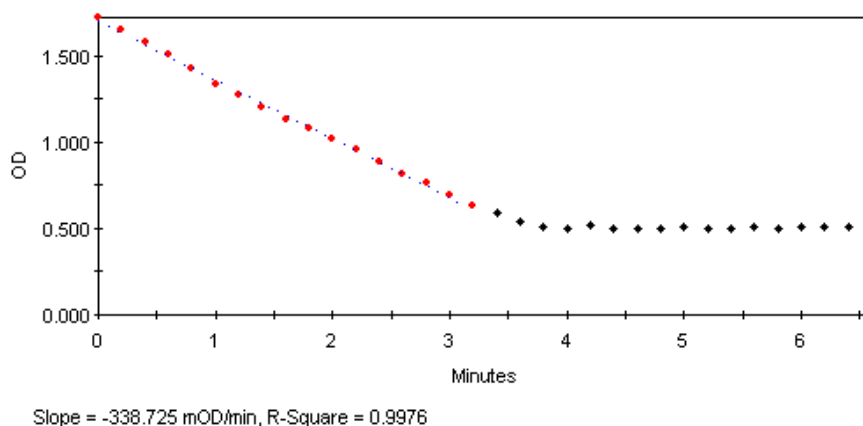


Figura 14. Exemple de corba cinètica per a la determinació de l'activitat GPx.

Es pot convertir el valor absolut de la pendent obtinguda en unitats d'activitat GPx mitjançant la Llei de Beer-Lambert (ϵ_{340} del NADPH= 6.22 mM/cm). Una UI d'activitat GPx es defineix com la quantitat d'enzim necessària per oxidar 1 μ mol de NADPH per minut.

3.4.12. Tinció immunofluorescent i microscòpia confocal

La tinció immunofluorescent i la microscòpia confocal permeten, entre altres aplicacions, analitzar la localització d'una proteïna o d'un antigen concret dins la cèl·lula. Durant l'estada predoctoral al *Institute of Cardiovascular and Medical Sciences* de la Universitat de Glasgow es va analitzar la localització cel·lular del NF- κ B a cèl·lules HUVEC (veure secció 4.4.).

Les cèl·lules es feren créixer sobre cobreobjectes localitzats al fons de pouets de plaques p6. Una vegada finalitzats els tractaments corresponents, es va decantar el medi i les cèl·lules varen ser fixades amb paraformaldehid 3% en PBS durant 25 minuts per tal de preservar l'estructura i la localització de les proteïnes i els components cel·lulars. A continuació s'efectuaren rentats amb PBS i es varen permeabilitzar les mostres amb tritó X-100 0.1% en PBS

durant 10 minuts per a permetre l'accés dels anticossos a l'interior de la cèl·lula.

Una vegada les mostres havien estat fixades i permeabilitzades, les incubacions posteriors es dugueren a terme en un ambient humit i protegit de la llum. La següent passa va consistir en bloquejar la mostra per evitar la unió dels anticossos a antigens inespecífics. El bloqueig es va fer amb tritó X-100 0.1% i sèrum 10% en PBS durant 20 minuts. És important que el sèrum emprat sigui de la mateixa espècie a partir de la qual s'han obtingut els anticossos secundaris; en aquest cas, va ser sèrum de cabra. Una vegada realitzat el bloqueig, es va afegir tampó de rentat (Tritó X-100 0.1%, BSA 1% en PBS) i s'incubà amb l'anticòs primari pel NF- κ B durant 1 hora a dilució 1:70 en tampó de rentat. Després de realitzar tres rentats per eliminar l'excés d'anticòs primari, s'incubà amb anticòs secundari Alexa Fluor 488 (Thermofisher) a dilució 1:200 en tampó de rentat durant 1 hora. Es realitzaren tres rentats més i es va tenyir el nucli amb el fluoròfor *red-dot nuclear staining* durant 10 minuts. Finalment, després de realitzar tres rentats més, es varen muntar els cobreobjectes i els portaobjectes mitjançant medi de muntatge.

Per a la visualització es va emprar un microscopi confocal LSM Pascal Exciter (Zeiss Group, Oberkochen, Alemanya). La microscòpia confocal es basa en l'orientació relativa de dos diafragmes. A més, l'ús de làsers com a font de llum permet la il·luminació d'una regió molt petita de la mostra. Fent un escaneig de diversos punts es poden obtenir imatges d'una resolució molt més elevada que la microscòpia de fluorescència convencional de manera que es pot, per exemple, detectar la localització intracel·lular d'una proteïna.

Els raigs de llum que provenen de la font d'il·luminació travessen un primer diafragma, són reflectits per un mirall dicroic i s'enfoquen cap a un punt de la mostra mitjançant un objectiu (fig. 15). En el cas d'un microscopi confocal de fluorescència, la mostra emet llum de major longitud d'ona que retorna pel

mateix camí òptic i és enfocada pel mirall dicroic cap a un segon diafragma o *pinhole*, el qual bloqueja els raigs que provenen de zones de fora del focus i deixa passar únicament que estan en focus, de manera que aquests arriben al detector. Es varen analitzar les imatges amb el propi programa del microscopi i la intensitat de la fluorescència dins i fora del nucli amb el programa *Image J*.

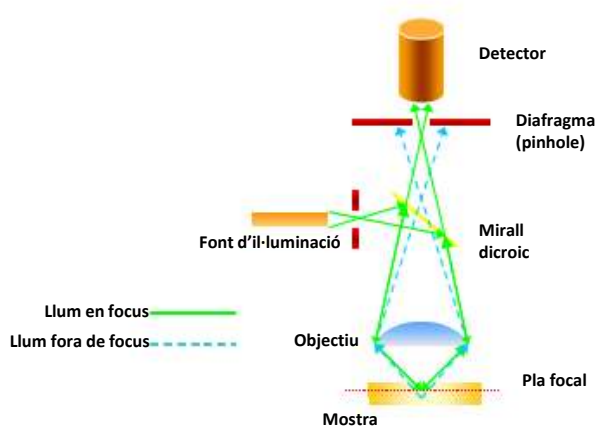


Figura 15. Esquema d'un microscopi confocal

3.4.13. Immunoprecipitació

La immunoprecipitació és una tècnica que s'empra per enriquir o purificar una proteïna específica o un grup de proteïnes mitjançant un anticòs immobilitzat a un suport sòlid. Aquestes proteïnes purificades poden ser analitzades mitjançant un Western blot. Durant l'estada predoctoral al *Institute of Cardiovascular and Medical Sciences* de la Universitat de Glasgow, es va immunoprecipitar la proteïna TAK1 a partir de lisats cel·lulars de HUVECs.

L'anticòs específic per a la TAK1 era una immunoglobulina IgG1 de ratolí, de manera que s'utilitzà proteïna G-safarosa com a suport sòlid. Es varen emprar 5 μ l de safarosa per mostra els quals varen ser rentats amb tampó IP (Tris-HCl 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, $\text{Na}_4\text{O}_7\text{P}_2$ 5 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, benzamidina 0.1 mM, Na_3VO_4 2mM, PMSF 0.1 mM, inhibidor de la tripsina 5 μ g/ml, Tritó X-100 1%, glicerol 1%). Els rentats varen consistir en una centrifugació a 1000g durant un minut, de manera que les boles de

safarosa precipiten. Aleshores es va afegir 1 µg d'anticòs en un volum final de 300 µl de tampó IP i es va agitar durant 1h a 4°C a fi de que l'anticòs s'unís a la safarosa. Després d'efectuar tres rentats amb tampó IP, es va afegir el volum de lisat cel·lular corresponent a 50 µg de proteïna en un volum final de 300 µl de tampó IP, i es va incubar 4 h a 4°C en agitació a fi que la proteïna TAK1 s'unís al complex safarosa-anticòs. Seguidament es va centrifugar la 1000g durant 1 minut i s'obtingué un precipitat amb les boles de safarosa-anticòs unides a la TAK1, el qual va ser rentat dues vegades amb tampó IP amb NaCl 1M per eliminar unions inespecífiques dèbils de l'anticòs amb proteïnes de la mostra. Després de dos rentats més amb tampó IP, es va fer un darrer rentat amb un tampó Brij (HEPES 50 mM pH 7.4, DTT 1 mM, Brij-35 0.02%) per a rompre la unió de l'anticòs i la safarosa, i de la TAK1 amb l'anticòs. Finalment es va guardar l'immunoprecipitat a -20°C i es varen analitzar els nivells de TAK1 i la seva fosforilació per Western blot (veure secció 4.4.).

És important remarcar que el producte final conté elevades concentracions de l'anticòs en estat desnaturalitzat, és a dir, amb una separació de la cadena pesada i la lleugera les quals tenen un pes molecular aproximat de 50 i 25 kDa respectivament. Això provoca que al Western blot apareguin dues bandes molt intenses que coincideixen amb aquests pesos moleculars. No obstant això, com que la TAK1 té un pes molecular d'uns 80 kDa, les bandes de les immunoglobulines no varen interferir en la seva detecció.

3.5. Anàlisi estadístic

Per a l'anàlisi estadístic es va emprar el programa SPSS 21.0 per a Windows (Chicago, EUA).

Anàlisi estadístic dels resultats de l'experiment amb rates ovariectomitzades

Les dades s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de 6 animals per grup. Les diferències entre grups varen ser analitzades mitjançant un anàlisi de la variància (ANOVA). Les diferències es consideraren significatives quan el valor de p era inferior a 0.05. Aleshores es va aplicar el test de la mínima diferència significativa (DMS) com a post-hoc per a determinar entre quins grups hi havia diferències.

Anàlisi estadístic dels resultats de l'experiment amb rates alimentades amb una dieta hiperlipídica

Les dades s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de 7 animals per grup. Es va aplicar un test ANOVA de dos factors (sexes i HFD, ANOVA 1) per analitzar les diferències entre sexes en l'efecte de la HFD, així com un segon ANOVA de dos factors (sexes i Rsg, ANOVA 2) per determinar les diferències entre sexes en la resposta a la Rsg. Es va considerar significatiu un valor de p inferior a 0.05 i es va aplicar un test t de Student com a post-hoc.

Anàlisi estadístic dels resultats dels experiments amb cardiomiòcits H9c2

Les dades es presenten com a mitjana \pm error estàndard de 6 mostres per tractament obtingudes a partir d'experiments independents realitzats per duplicat o triplicat. En tots els casos les diferències varen ser significatives quan el valor de p era inferior a 0.05. Per a l'experiment amb agonistes i antagonistes dels receptors d'estrògens (apartat 4.1), les diferències entre grups

varen ser analitzades mitjançant un test t de Student. A l'experiment de lipotoxicitat i disfunció mitocondrial (apartat 4.2), l'efecte del palmitat i l'E₂ va ser analitzat amb un ANOVA de dos factors. Per a l'experiment de lipotoxicitat i inflamació (apartat 4.3), es varen aplicar quatre tests t de Student per a comprovar l'efecte del PA, del A769662, de l'E₂ i del compost c respectivament.

Anàlisi estadístic dels experiments amb cèl·lules endotelials HUVECs

Les dades es presenten com a mitjana \pm error estàndard de dos o tres experiments independents ($n=2$ o $n=3$), en funció del paràmetre estudiat. Les diferències entre grups varen ser analitzades mitjançant un test t de Student aplicant un valor de p menor a 0.05 com a significatiu.

4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

4.1 Efectes dels estrògens i els seus receptors sobre la funció i la biogènesi mitocondrials i l'estrès oxidatiu al múscul cardíac

Els resultats presentats en aquest estudi s'han obtingut a partir d'experiments realitzats amb rates ovariectomitzades i amb cardiomiòcits H9c2 tractats amb E_2 i agonistes i antagonistes específics dels receptors estrogènics. L'objectiu d'aquest estudi és analitzar el paper de l' E_2 en el dimorfisme sexual en la funció i la biogènesi mitocondrials i en l'estrès oxidatiu del múscul cardíac que prèviament s'ha descrit (Colom et al., 2007b), així com determinar a través de quins receptors l' E_2 produeix els seus efectes.

4.1.1. Resultats

Efecte de l'ovariectomia i l'administració d'estradiol sobre els pesos corporal i cardíac, la composició cardíaca i els nivells circulants d'hormones ovàriques

L'ovariectomia va provocar un augment del pes corporal i de l'adipositat, els quals varen disminuir en resposta a l'administració d' E_2 (taula 8). El pes del cor també es va incrementar amb l'ovariectomia, mentre que el pes relatiu d'aquest òrgan va ser menor als animals ovariectomitzats i s'incrementà amb l'administració d' E_2 sense assolir els valors dels controls. No hi va haver diferències significatives entre grups en la composició del múscul cardíac. L'ovariectomia va provocar una disminució dels nivells sèrics d' E_2 i de progesterona, però només va ser significatiu en el cas de la progesterona. L'administració d' E_2 va incrementar els nivells sèrics d'ambdues hormones, però, mentre que els nivells de progesterona no arribaren als valors del grup control, els nivells d' E_2 varen ser més de dues vegades superiors als d'aquest.

Taula 8. Efecte de l'ovariectomia i l'administració d'estradiol sobre els pesos corporal i cardíac, l'índex d'adipositat, la composició cardíaca i els nivells circulants d'hormones ovàriques.

	Control	OVX	OVX+E2	ANOVA
Pes corporal (g)	218 ± 5	287 ± 7 ^a	241 ± 2 ^{ab}	H
Pes cor				
(g)	0.667 ± 0.012	0.736 ± 0.011 ^a	0.720 ± 0.009 ^a	H
(g/100 g PC)	0.327 ± 0.004	0.262 ± 0.004 ^a	0.300 ± 0.004 ^{ab}	H
Índex d'adipositat (%)	4.80 ± 0.68	7.27 ± 0.44 ^a	5.30 ± 0.28 ^b	H
Proteïnes (mg/g txt)	167 ± 17	204 ± 20	189 ± 5	NS
DNA (mg/g txt)	5.91 ± 0.18	5.71 ± 0.28	6.12 ± 0.37	NS
TG (mg/g txt)	9.90 ± 0.62	10.3 ± 1.1	11.3 ± 0.4	NS
E ₂ (%)	100 ± 24	61.3 ± 9.7	240 ± 103 ^{ab}	H
Progesterona (ng/ml)	22.6 ± 2.7	4.30 ± 1.37 ^a	10.7 ± 2.8 ^{ab}	H

OVX, rates ovariectomitzades; OVX+E2, rates ovariectomitzades tractades amb 17 β -estradiol; PC, pes corporal; TG, triglicèrids; E₂, 17 β -estradiol. Els valors s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de 6 animals per grup. ANOVA ($p < 0.05$): H, efecte hormonal; NS, no hi ha efecte significatiu. Post-hoc (DMS, $p < 0.05$): *a* indica diferència respecte al grup control; *b* indica diferència respecte al grup OVX.

Evolució temporal del pes corporal i la ingesta en resposta a l'ovariectomia i l'administració d'estradiol

Durant tot l'estudi, el pes corporal va ser major als animals ovariectomitzats (fig. 16) i es va reduir amb l'administració d'E₂ encara que sense arribar en cap moment als valors dels animals control. La ingesta total també va ser major a les rates ovariectomitzades, però en aquest cas disminuï per sota els nivells dels controls amb el tractament hormonal. La ingesta referida al pes corporal va ser similar entre els animals control i els ovariectomitzats fins a les 13 setmanes d'edat, moment a partir del qual va ser major als animals control. L'administració d'E₂ disminuï inicialment la ingesta referida al pes corporal, però s'igualà als grup OVX a partir de la tercera setmana de tractament.

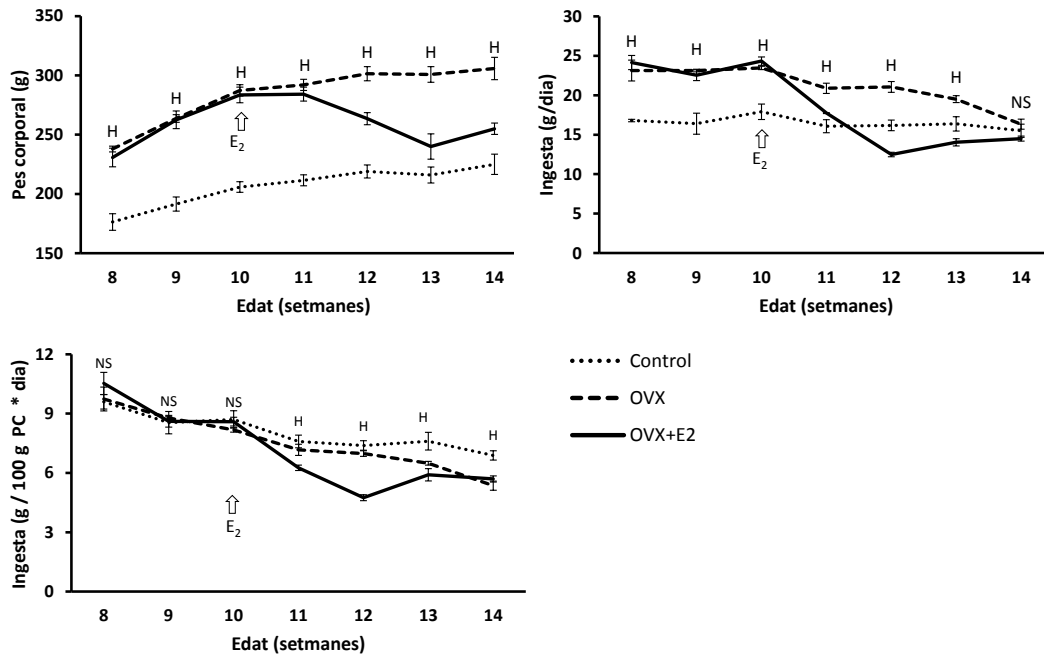


Figura 16. Evolució temporal del pes corporal i la ingesta en resposta a l'ovariectomia i l'administració d'E2. OVX, rates ovariectomitzades; OVX+E2, rates ovariectomitzades tractades amb 17β -estradiol. Els valors s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de 6 animals per grup. ANOVA ($p < 0.05$): H, efecte hormonal; NS, no hi ha efecte significatiu.

Efecte de l'ovariectomia i l'administració d'estradiol sobre marcadors de funció i biogènesi mitocondrial al múscul cardíac

Els nivells de PGC-1 α no es varen modificar amb l'ovariectomia (fig. 17), però s'incrementaren notablement amb l'administració d'E₂ fins a nivells molt superiors als del grup control. El consum d'oxigen de les miofibres cardíacques va ser menor al grup OVX en comparació als controls quan s'emprà glutamat:malat o palmitoilcarnitina com a substrats, però al darrer cas les diferències no arribaren a ser estadísticament significatives ($p = 0.074$). La disminució del consum d'oxigen no va ser completament revertida amb la suplementació d'E₂. L'activitat COX també va disminuir amb l'ovariectomia, però en aquest cas va ser restituïda amb el reemplaçament estrogènic. Els nivells proteics de COX IV no varen ser diferents entre els grups experimentals, de manera que el rati activitat COX/COX IV, indicatiu de l'activitat específica de la COX, va disminuir amb l'ovariectomia i es va

incrementar amb l'administració d'E₂. Els nivells de mtDNA, un marcador del contingut mitocondrial, varen ser majors a les rates OVX en comparació al grup control i no es modificaren amb el tractament d'E₂.

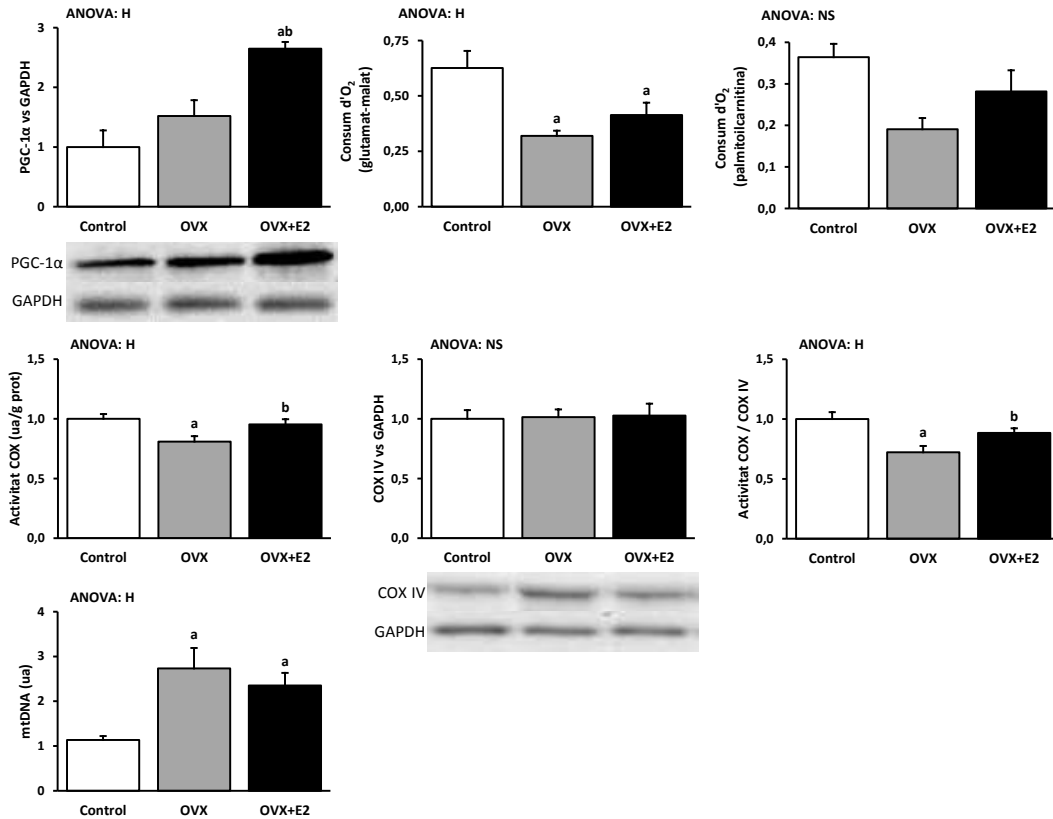


Figura 17. Efecte de l'ovariectomia i l'administració d'E₂ sobre marcadors de funció i biogènesi mitocondrials al múscul cardíac. OVX, rates ovariectomitzades; OVX+E₂, rates ovariectomitzades tractades amb 17β-estradiol; PGC-1α (90 kDa), coactivador 1α del receptor activat per proliferadors peroxisomals γ; COX (16 kDa), citocrom c oxidasa; COX IV, subunitat IV de la COX; mtDNA, DNA mitocondrial. El consum d'oxigen a les fibres permeabilitzades es va mesurar mitjançant l'addició de glutamat:malat (5:2.5 mM) o palmitoilcarnitina (2.5 mM) i s'expressa en forma de VO₂/min/mg. Els valors s'expressen com a mitjana ± error estàndard de 6 animals per grup. ANOVA (p<0.05): H, efecte hormonal; NS, no hi ha efecte significatiu. Post-hoc (DMS, p<0.05): a indica diferència respecte al grup control; b indica diferència respecte al grup OVX.

Efecte de l'ovariectomia i l'administració d'estradiol sobre marcadors d'estrès oxidatiu al múscul cardíac

L'ovariectomia va incrementar la producció de H₂O₂ usant glutamat i malat com a substrats (fig. 18). Amb aquests mateixos substrats, l'ovariectomia va

provocar un augment de la producció de H_2O_2 respecte el consum d' O_2 , la qual cosa és indicadora d'una menor eficiència en la utilització de l'oxigen. Aquesta eficiència va augmentar amb el tractament d' E_2 . Quan s'emprà palmitoilcarnitina, en canvi, no s'observaren diferències significatives entre grups. L'ovariectomia també va disminuir l'activitat SOD, la qual va ser restaurada amb l'administració d' E_2 , juntament amb uns majors nivells d'UCP2 i UCP3. Els nivells dels grups carbonils, indicadors del dany oxidatiu proteic, varen ser majors al grup OVX i disminuïren amb la suplementació d' E_2 , mentre que els nivells de 4-HNE, indicadors de la peroxidació lipídica, no varen variar entre grups.

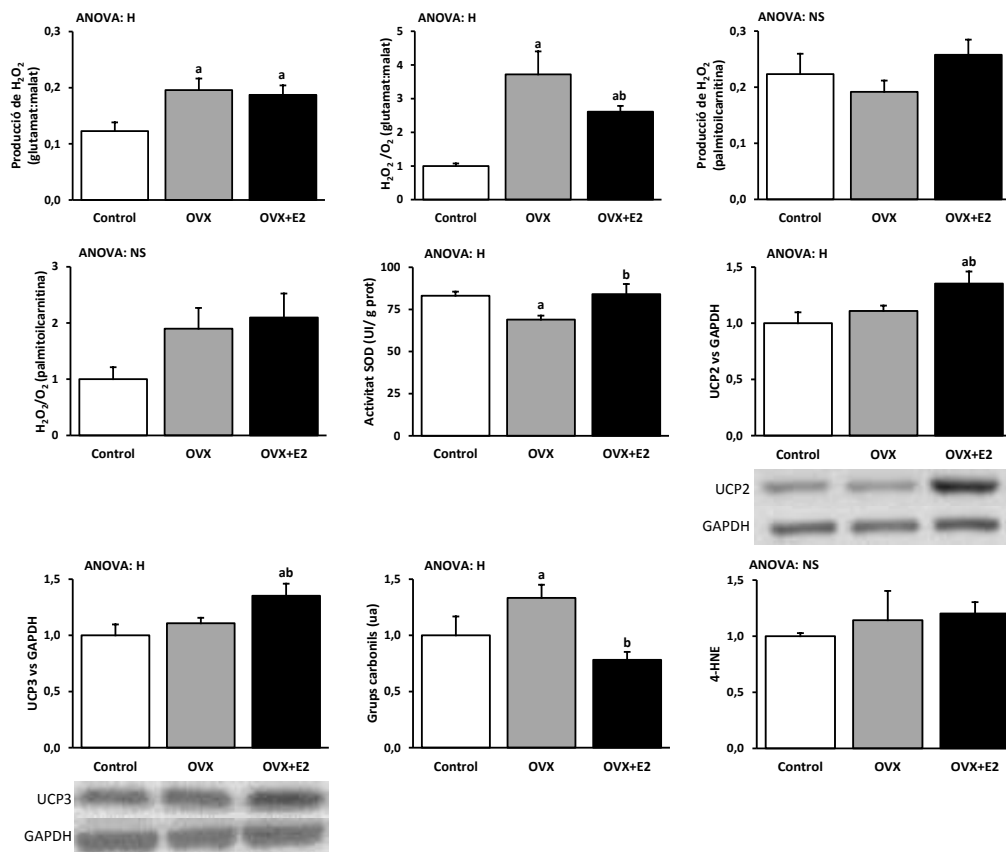


Figura 18. Efecte de l'ovariectomia i l'administració d' E_2 sobre l'estrès oxidatiu al múscul cardíac. OVX, rates ovariectomitzades; OVX+E2, rates ovariectomitzades tractades amb 17β -estradiol; SOD, superòxid dismutasa; UCP2 (35 kDa), UCP3 (32 kDa), proteïnes desacoblants 2 i 3; 4-HNE, 4-hidroxi-nonelal. La producció de H_2O_2 es va mesurar a miofibres permeabilitzades mitjançant l'addició de glutamat:malat (5:2.5 mM) o palmitoilcarnitina (2.5 mM), i s'expressa en forma de pmols de H_2O_2 /min/mg. Els valors s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de 6 animals per grup. ANOVA ($p < 0.05$): H, efecte hormonal; NS, no hi ha efecte significatiu. Post-hoc (DMS, $p < 0.05$): *a* indica diferència respecte al grup control; *b* indica diferència respecte al grup OVX.

Efecte de l'ovariectomia i l'administració d'estradiol sobre els nivells cardíacs dels receptors estrogènics

No es varen observar diferències entre grups en els nivells d'ER α i ER β (fig. 19). En canvi, els nivells de GPER es varen incrementar notablement amb la suplementació d'E $_2$.

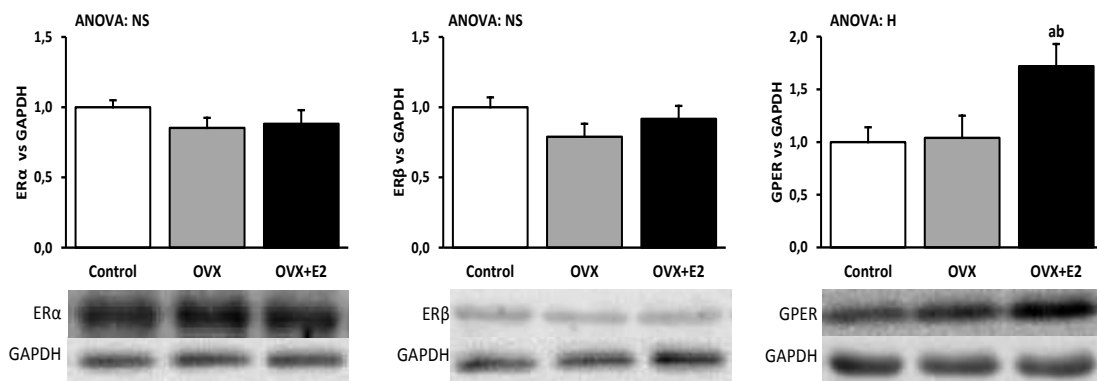


Figura 19. Efecte de l'ovariectomia i l'administració d'E $_2$ sobre els nivells dels receptors estrogènics al múscul cardíac. OVX, rates ovariectomitzades; OVX+E2, rates ovariectomitzades tractades amb 17 β -estradiol; ER α (66 kDa) i ER β (56 kDa), receptors d'estrògen α i β ; GPER (38 kDa), receptor d'estrògen acoblat a proteïnes G. Els valors s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de 6 animals per grup. ANOVA ($p < 0.05$): H, efecte hormonal; NS, no hi ha efecte significatiu. Post-hoc (DMS, $p < 0.05$): a indica diferència respecte al grup control; b indica diferència respecte al grup OVX.

Efecte de l'estradiol i dels agonistes i antagonistes dels receptors estrogènics sobre marcadors de biogènesi i funció mitocondrials i sobre la viabilitat cel·lular a cardiomiòcits H9c2

L'E $_2$ va incrementar l'expressió gènica del PGC-1 α i la COX I (fig. 20A) i els nivells proteics del PGC-1 α i la COX IV (fig. 20B). Ni els agonistes ni els antagonistes d'ER α i ER β tingueren algun efecte. Per contra, l'agonista de GPER va incrementar els nivells d'aquests marcadors de funció i biogènesi mitocondrials, i l'antagonista de GPER va neutralitzar els efectes de l'E $_2$. La viabilitat cel·lular no es va veure afectada per l'addició d'aquestes compostos (fig. 20C).

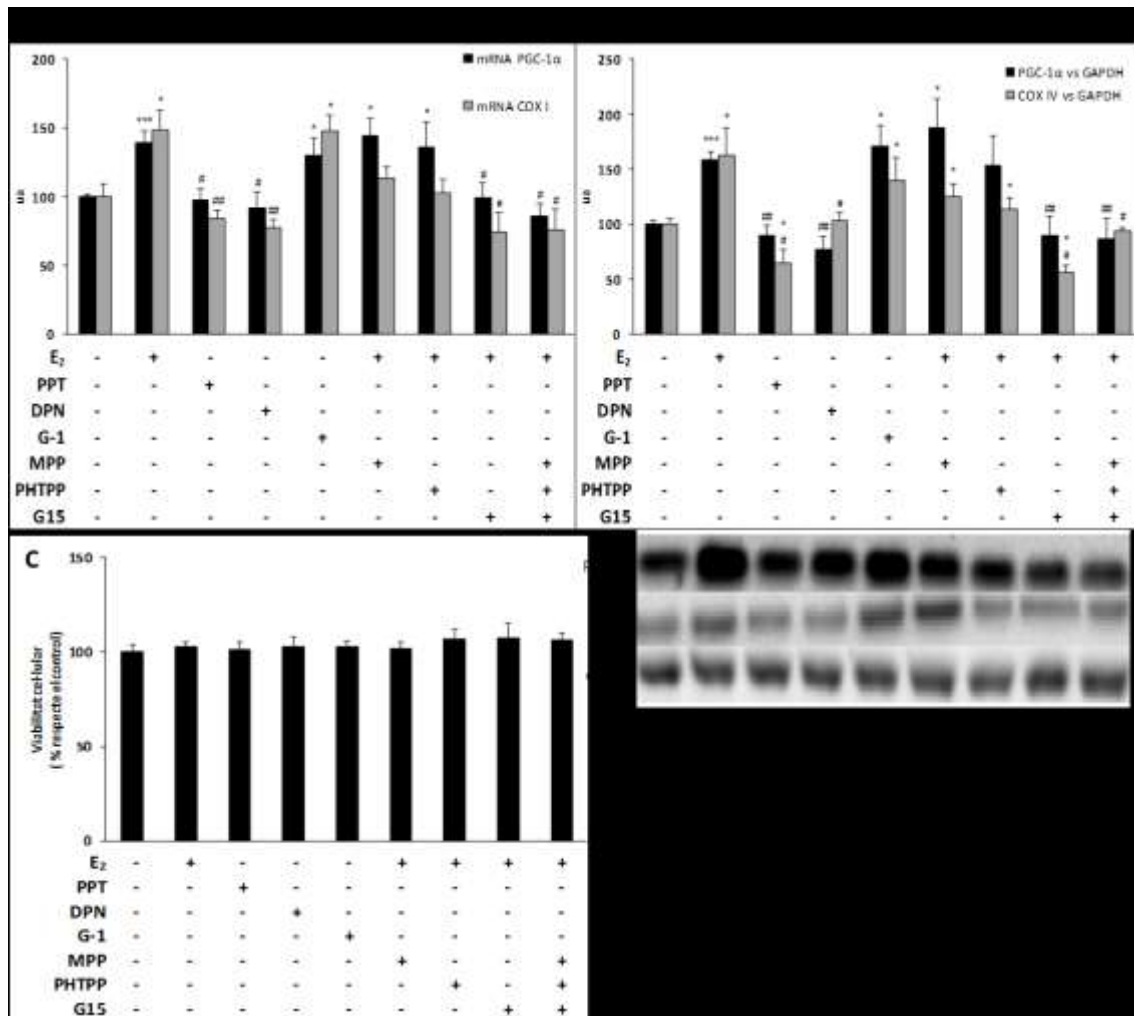


Figura 20. Efecte de l'E₂ i dels agonistes i antagonistes dels receptors estrogènics sobre l'expressió gènica (A) i els nivells proteics (B) de marcadors de biogènesi i funció mitocondrials i sobre la viabilitat cel·lular (C) a cardiomiòcits H9c2. PGC-1α (90 kDa), coactivador 1α del receptor activat per proliferadors peroxisomals γ; COX I, COX IV (16 kDa), subunitat I i IV de la citocrom c oxidasa. Les cèl·lules varen ser tractades amb E₂ (10 nM) o agonistes específics d'ERα (PPT, 1 μM), ERβ (DPN, 1 μM) o GPER (G-1, 1 μM), o E₂ (10 nM) en combinació amb antagonistes específics de d'ERα (MPP, 1 μM), ERβ (PHTPP, 1 μM) o GPER (G15, 1 μM) durant 24h. Els valors s'expressen com a mitjana ± error estàndard de tres experiments diferents realitzats per duplicat (n=6). Les diferències estadísticament significatives varen ser determinades mitjançant un test t de Student: * p < 0.05 en relació al control, *** p < 0.001 en relació al control, # p < 0.05 en relació a l'E₂, ## p < 0.01 en relació a l'E₂.

4.1.2. Discussió

Estudis previs realitzats al nostre grup d'investigació han posat de manifest que el cor de les rates femella presenta mitocondris més diferenciats que el dels mascles, la qual cosa està associada a una cadena de transport electrònic més eficient i a una menor producció de ROS (Colom et al., 2007b). En el present estudi, emprant rates ovariectomitzades i cardiomiòcits H9c2, es demostra un paper important de l'E₂ en aquest dimorfisme sexual i, a més, els resultats obtinguts suggereixen que el GPER contribueix activament als efectes de l'E₂.

En aquest estudi es va observar un increment del pes corporal i de l'adipositat amb l'ovariectomia que es pot atribuir a la major ingesta que presentaven aquests animals. L'E₂ va revertir parcialment aquests efectes, possiblement a través d'una acció a nivell hipotalàmic que va conduir a la disminució de la ingesta i de l'adipositat (Brown and Clegg, 2010; Eckel, 2011).

L'ovariectomia va provocar una pèrdua de la capacitat oxidativa mitocondrial cardíaca, fet que estaria d'acord amb la disfunció mitocondrial cardíaca que presenten les rates femella de 24 mesos d'edat (Colom et al., 2014), la qual estaria relacionada amb una disminució dels nivells d'estrògens. L'E₂ va restaurar parcialment aquesta capacitat oxidativa a les rates ovariectomitzades i va incrementar l'expressió de COX I i els nivells proteics de COX IV a cardiomiòcits H9c2. Aquests efectes de l'E₂ són paral·lels a un augment dels nivells de PGC-1 α tant *in vivo* com *in vitro*, la qual cosa suggereix que l'E₂ estimula la funció mitocondrial cardíaca a través de l'increment del PGC-1 α , el qual és un regulador clau de la biogènesi mitocondrial i, per tant, de l'estatus energètic i de la funció contràctil cardíaca (Arany et al., 2005). Així doncs, els resultats obtinguts demostren la contribució de l'E₂ en el dimorfisme sexual en la diferenciació mitocondrial cardíaca prèviament descrita (Colom et al., 2007b). Resultats similars als nostres, obtinguts al múscul esquelètic de

rates ovariectomitzades (Capllonch-Amer et al., 2014b), reforcen la idea de l'E₂ com activador de la biogènesi mitocondrial a través del PGC-1 α .

La disminució de la funció mitocondrial cardíaca a les rates ovariectomitzades va propiciar una menor eficiència en l'ús de l'oxigen i una major producció de H₂O₂, la qual cosa, juntament amb una menor activitat SOD, va provocar un major dany oxidatiu proteic. Per tant, sembla que la privació de les hormones ovàriques origina estrès oxidatiu al múscul cardíac degut a que les defenses antioxidants no són capaces de contrarestar la major producció de ROS. En concordança, el tractament amb E₂ va millorar l'eficiència en l'ús de l'oxigen i va incrementar les defenses antioxidants (SOD, UCP2 i UCP3), de manera que el dany oxidatiu va disminuir. En aquest sentit, cal destacar que s'ha descrit que els nivells musculars d'UCP3 s'incrementen a les femelles en resposta a l'estrès oxidatiu induït per una HFD (Gómez-Pérez et al., 2008), fet que podria ser degut als estrògens (Capllonch-Amer et al., 2014b). Per tant, l'E₂ podria mitigar l'estrès oxidatiu a través d'un increment dels nivells de les UCPs als músculs cardíac i esquelètic. Aquests efectes de l'E₂ podrien deure's novament a una modulació del PGC-1 α , el qual s'ha vist que pot activar l'expressió de proteïnes antioxidants i, per tant, disminuir l'estrès oxidatiu (Kang and Li Ji, 2012). En conjunt, aquests resultats suggereixen que l'E₂, a més d'incrementar la funció mitocondrial, redueix l'estrès oxidatiu cardíac mitjançant l'estimulació de mecanismes antioxidants, de manera que seria responsable, almenys en part, de les diferències entre sexes observades en l'estrès oxidatiu cardíac (Colom et al., 2007b).

En aquest estudi es va observar un major contingut mitocondrial a les rates OVX en comparació als controls, apuntant a que el menor contingut mitocondrial observat a rates femella (Colom et al., 2007b) podria atribuir-se a l'acció de les hormones ovàriques. No obstant, la suplementació amb E₂ no va contrarestar l'efecte de l'ovariectomia, la qual cosa suggereix que l'E₂ no tindria una contribució important en aquest dimorfisme sexual. En canvi, s'ha

vist que l'administració de progesterona redueix l'augment del volum mitocondrial cardíac causat per l'ovariectomia (Rattanasopa et al., 2015). Així doncs, l'increment del contingut mitocondrial que nosaltres vàrem observar amb l'ovariectomia podria atribuir-se a la privació de progesterona. En aquest sentit, encara que es va produir una síntesi extraovàrica de progesterona en resposta a l'E₂, com ja s'ha descrit (Liu et al., 1997), els nivells d'aquesta hormona al grup OVX+E2 varen ser molt inferiors als dels controls, explicant així la manca de variació del contingut mitocondrial cardíac en aquest grup malgrat l'augment dels nivells circulants de progesterona. D'altra banda, s'ha descrit que les mutacions al genoma mitocondrial originades per l'excés de producció de ROS incrementen el contingut de mtDNA (Lee and Wei, 2005), de manera que també és plausible considerar l'augment dels nivells cardíacs de mtDNA en resposta a l'ovariectomia com un intent de neutralitzar el dany oxidatiu que s'hauria causat al genoma mitocondrial.

Tenint en compte aquests efectes de l'E₂ sobre la funció i la biogènesi mitocondrials cardíques, ens proposàrem indagar en els receptors a través dels quals l'E₂ modularia aquests efectes. Els cardiomiòcits expressen els dos receptors clàssics d'aquesta hormona, l'ER α i l'ER β , així com el més recentment descrit GPER (Prossnitz and Barton, 2011). En aquest estudi no es varen observar diferències entre grups en els nivells cardíacs d'ER α i d'ER β , però cal destacar que els efectes de l'ovariectomia i l'administració d'E₂ sobre els nivells cardíacs d'aquests receptors són contradictoris (Jankowski et al., 2001; Xu et al., 2003; Lizotte et al., 2009; Turdi et al., 2014). Les discrepàncies entre estudis podrien resultar de diferències en l'edat en la qual es va realitzar l'ovariectomia i/o en la duració del tractament hormonal. En canvi, s'ha de ressaltar que els nivells de GPER es varen incrementar remarcablement amb l'administració de l'E₂, la qual cosa apunta a una contribució del GPER als efectes de l'E₂ sobre la funció i biogènesi mitocondrials cardíques. A més, l'augment dels nivells del GPER en resposta

a l'administració d'E₂ podria interpretar-se com un mecanisme cel·lular per potenciar els efectes d'aquesta hormona sobre el metabolisme energètic mitocondrial i l'estrès oxidatiu. Cal remarcar que un efecte similar de l'E₂ sobre els nivells de GPER ha estat descrit a cèl·lules d'adenocarcinoma d'endometri (Plante et al., 2012), però, en canvi, el tractament estrogènic no afecta l'expressió d'aquest receptor al múscul esquelètic de ratolins ovariectomitzats (Baltgalvis et al., 2010), suggerint que l'efecte de l'E₂ sobre l'expressió del GPER podria variar entre diferents teixits.

Per aprofundir en la contribució dels receptors estrogènics als efectes mitocondrials de l'E₂, es varen estudiar els efectes d'agonistes i antagonistes específics d'aquests receptors sobre els nivells de marcadors de biogènesi i funció mitocondrials a cardiomiòcits H9c2. Els resultats indiquen que els efectes de l'E₂ no estan modulats a través d'ER α o d'ER β . En canvi, l'agonista del GPER va mimetitzar els efectes de l'E₂ incrementant els nivells d'aquests marcadors, mentre que l'antagonista els va contrarestar, suggerint que el GPER és el receptor estrogènic responsable de la modulació de la funció i biogènesi mitocondrials per part de l'E₂ als cardiomiòcits. No obstant això, en un estudi previ s'ha vist que l'ER α i l'ER β estimulen la biogènesi mitocondrial cardíaca en un model de disfunció cardíaca (Hsieh et al., 2005). Els autors, però, no varen analitzar la possible contribució del GPER, de manera que no està descartat que l'E₂ moduli la biogènesi mitocondrial a través del GPER en aquest model de disfunció cardíaca. En aquest sentit, és important destacar que el present estudi és el primer en assenyalar al GPER com un modulador dels efectes de l'E₂ sobre la funció i biogènesi mitocondrials. De fet, l'activació del GPER s'ha vist que activa a la proteïna d'unió a l'element de resposta a cAMP (CREB) (Kanda and Watanabe, 2004), un factor de transcripció que pot activar la transcripció del gen del PGC-1 α (Wu et al., 2006). A més, s'ha descrit que el GPER activa a l'eNOS al cor de rates hipertenses (De Francesco et al., 2013) i l'activació de l'eNOS provoca un increment dels

nivells de PGC-1 α (Hu et al., 2014). Per tant, s'haurien de dur a terme futurs estudis per analitzar la contribució del CREB i l'eNOS als efectes del GPER sobre la biogènesi mitocondrial cardíaca. S'han descrit múltiples funcions cardioprotectors del GPER, com ara la inhibició del creixement cardíac i l'apoptosi, i la millora de la contractilitat cardíaca (Prossnitz and Barton, 2014). Els nostres resultats ofereixen un nou rol cardioprotector del GPER a través de la modulació del metabolisme mitocondrial, el qual és clau pel manteniment d'una correcta funció cardíaca. Aquests resultats, per tant, suggereixen que el GPER seria una diana terapèutica important a tenir en compte pel tractament de les malalties cardíques.

En conjunt, aquests resultats demostren com l'E₂ estimula la biogènesi mitocondrial cardíaca incrementant la capacitat oxidativa mitocondrial i reduint l'estrès oxidatiu. En conseqüència, aquesta hormona podria tenir una contribució important en el dimorfisme sexual cardíac prèviament descrit, en el qual les femelles presenten una major diferenciació mitocondrial i un menor dany oxidatiu que els mascles (Colom et al., 2007b). A més, aquests efectes de l'E₂ semblen estar modulats a través del GPER, de manera que per primer cop s'observa un paper d'aquest receptor estrogènic sobre el metabolisme mitocondrial. Els resultats del present estudi permeten una millor comprensió de les bases moleculars de l'increment de la incidència de malaltia cardíaca a les dones després de la menopausa.

4.2 Dimorfisme sexual en el metabolisme energètic cardíac en condicions lipotòxiques: efecte de la rosiglitazona

Els resultats presentats en aquest capítol corresponen a un estudi realitzat amb rates alimentades amb una dieta hiperlipídica (HFD) i amb cardiomiòcits H9c2 tractats amb palmitat (PA). L'objectiu s'ha centrat en analitzar les diferències entre sexes en el desenvolupament de lipotoxicitat cardíaca provocada per l'alimentació amb una HFD i en la resposta del cor lipotòxic a l'administració de rosiglitazona (Rsg), així com determinar el possible paper de l'estradiol (E_2) en aquest dimorfisme.

4.2.1. Resultats

Efecte de la HFD i el tractament amb Rsg sobre els pesos corporal i cardíac, l'índex d'adipositat i la composició del múscul cardíac

El pes corporal es va incrementar als dos sexes en resposta a la HFD i no es va veure afectat per l'administració de Rsg (taula 9). El pes total del cor va ser superior als mascles i no es va alterar per la HFD ni pel tractament amb Rsg a cap dels dos sexes. El pes cardíac específic va ser superior a les femelles i va disminuir als dos sexes en resposta a la HFD. Els efectes de la HFD incrementant l'índex d'adipositat varen ser més marcats als mascles i, en resposta a la Rsg, aquest índex va disminuir en ambdós sexes. La composició en proteïnes i en DNA del múscul cardíac no va variar en els diferents grups experimentals.

Taula 9. Efecte de la HFD i del tractament amb Rsg sobre els pesos corporal i cardíac, l'índex d'adipositat i la composició del múscul cardíac.

		Control	HFD	HFD+Rsg	ANOVA 1	ANOVA 2
Pes corporal (g)	<i>Mascle</i>	450 ± 15	503 ± 16 ^b	481 ± 9	S, D	S
	<i>Femella</i>	241 ± 4 ^a	277 ± 16 ^{ab}	264 ± 5 ^a		
Pes cardíac (g)	<i>Mascle</i>	0.947 ± 0.032	1.07 ± 0.05	0.991 ± 0.030	S	S
	<i>Femella</i>	0.684 ± 0.021 ^a	0.653 ± 0.023 ^a	0.645 ± 0.017 ^a		
Pes cardíac específic (g/100g pes corporal)	<i>Mascle</i>	0.216 ± 0.005	0.209 ± 0.004	0.208 ± 0.005	S, D	S
	<i>Femella</i>	0.271 ± 0.009 ^a	0.247 ± 0.006 ^{ab}	0.242 ± 0.004 ^a		
Índex d'adipositat (%)	<i>Mascle</i>	6.08 ± 0.02	12.0 ± 0.6 ^b	8.31 ± 0.62 ^c	S, S*D	R
	<i>Femella</i>	6.63 ± 0.62	9.52 ± 0.91 ^{ab}	8.38 ± 0.48		
Proteïnes (mg/g teixit)	<i>Mascle</i>	173 ± 15	173 ± 14	178 ± 14	NS	NS
	<i>Femella</i>	185 ± 19	179 ± 17	170 ± 13		
DNA (mg /g teixit)	<i>Mascle</i>	5.24 ± 0.18	5.66 ± 0.15	6.21 ± 0.49	NS	NS
	<i>Femella</i>	6.23 ± 0.17	5.93 ± 0.15	5.76 ± 0.24		

HFD, dieta hiperlipídica; Rsg, rosiglitazona. Els valors s'expressen com a mitjana ± error estàndard de 7 animals per grup. ANOVA 1 (p<0.05): S, efecte de sexe; D, efecte de la HFD, S*D, efecte interactiu sexe i HFD, NS, no hi ha efecte significatiu. T-test (p<0.05): *a*, femelles vs mascles; *b*, HFD vs control. ANOVA 2 (p<0.05): S, efecte de sexe; R, efecte de la Rsg, S*R, efecte interactiu sexe i Rsg, NS, no hi ha efecte significatiu. T-test (p<0.05): *a*, femelles vs mascles; *c*, HFD+Rsg vs HFD.

Efecte de la HFD i el tractament amb Rsg sobre paràmetres sèrics

Els efectes de la HFD incrementant la triglicèridèmia varen ser més notoris als mascles (taula 10), els quals també varen augmentar els nivells de NEFAs. Els efectes hipolipemians de la Rsg varen ser majors als mascles i es fan patents a través d'una major disminució de la triglicèridèmia i dels nivells de NEFAs. La Rsg va tenir un efecte hipoglucèmiat als dos sexes, però les femelles varen assolir una glicèmia en dejú inferior a la dels mascles. La insulínèmia va ser major a les rates mascle i, en situació de dejú, es va incrementar als dos sexes en resposta a la HFD i a l'administració de Rsg, encara que en aquest darrer cas l'efecte va ser molt més accentuat als mascles. L'HOMA-IR va ser considerablement superior a les rates mascle i es va incrementar als dos sexes en resposta a la HFD. Els nivells d'adiponectina varen augmentar amb la HFD únicament a les femelles, mentre que els de leptina ho feren als dos sexes però especialment als mascles. El tractament amb Rsg va provocar un augment dels nivells d'adiponectina, sobretot als mascles, així com una disminució de la leptinèmia als dos sexes. L'índex leptina/adiponectina, utilitzat també com a marcador de resistència a la insulina, va ser major a les rates mascle i va augmentar únicament en aquest sexe en resposta a la HFD, mentre que l'administració de Rsg va provocar una important disminució d'aquest índex, especialment a les rates mascle. Únicament als mascles es va observar una lleugera intolerància a la glucosa en resposta a la HFD (fig. 21), la qual es va incrementar mitjançant l'administració de Rsg.

Taula 10. Efecte de la HFD i del tractament amb Rsg sobre paràmetres sèrics.

		Control	HFD	HFD+Rsg	ANOVA 1	ANOVA 2
TG (mg/dl)	<i>Mascle</i>	197 ± 15	314 ± 12 ^b	163 ± 4 ^c	S, D, S*D	S, R, S*R
	<i>Femella</i>	172 ± 14	229 ± 17 ^{ab}	166 ± 4 ^c		
NEFAs (mM)	<i>Mascle</i>	0.548 ± 0.052	0.727 ± 0.013 ^b	0.574 ± 0.010 ^c	D, S*D	R, S*R
	<i>Femella</i>	0.611 ± 0.021	0.598 ± 0.033 ^a	0.593 ± 0.062		
Glucosa (mg/dl)	<i>Mascle</i>	161 ± 4	156 ± 2	147 ± 6	NS	R
	<i>Femella</i>	158 ± 6	154 ± 5	136 ± 5 ^c		
Glucosa en dejú (mg/dl)	<i>Mascle</i>	136 ± 3	140 ± 4	121 ± 4 ^c	NS	S, R
	<i>Femella</i>	137 ± 5	138 ± 4	103 ± 5 ^{ac}		
Insulina (µg/l)	<i>Mascle</i>	0.897 ± 0.183	0.798 ± 0.094	0.685 ± 0.046	S	S
	<i>Femella</i>	0.560 ± 0.056 ^a	0.500 ± 0.013 ^a	0.517 ± 0.029 ^a		
Insulina en dejú (µg/l)	<i>Mascle</i>	0.687 ± 0.069	1.04 ± 0.18	2.48 ± 0.13 ^c	S, D	S, R, S*R
	<i>Femella</i>	0.260 ± 0.014 ^a	0.309 ± 0.022 ^{ab}	0.374 ± 0.015 ^{ac}		
HOMA-IR	<i>Mascle</i>	7.31 ± 1.03	12.6 ± 2.5 ^b	19.1 ± 2.4	S, D	S
	<i>Femella</i>	2.46 ± 0.14 ^a	3.10 ± 0.25 ^a	2.72 ± 0.13 ^a		
Adiponectina (µg/ml)	<i>Mascle</i>	24.0 ± 1.4	21.3 ± 1.6	54.3 ± 3.0 ^c	S, D, S*D	S, R, S*R
	<i>Femella</i>	25.0 ± 1.7	36.6 ± 0.6 ^{ab}	56.7 ± 4.3 ^c		
Leptina (ng/ml)	<i>Mascle</i>	9.23 ± 1.20	23.3 ± 3.2 ^b	13.0 ± 2.1 ^c	S, D, S*D	S, R
	<i>Femella</i>	4.36 ± 0.90 ^a	7.70 ± 1.04 ^{ab}	6.29 ± 0.38 ^a		
Leptina/adiponectina (ua)	<i>Mascle</i>	0.492 ± 0.069	1.07 ± 0.16 ^b	0.239 ± 0.035 ^c	S, D, S*D	S, R, S*R
	<i>Femella</i>	0.218 ± 0.025 ^a	0.278 ± 0.018 ^a	0.107 ± 0.017 ^{ac}		

HFD, dieta hiperlipídica; Rsg, rosiglitazona; TG, triglicèrids; NEFAs, àcids grassos no esterificats, HOMA-IR, model homeostàtic d'estimació de la resistència a la insulina. L'HOMA-IR es va calcular com $[20 \times \text{insulinèmia en dejú } (\mu\text{U/ml})] / [\text{glicèmia en dejú (mM)} - 3.5]$. Els valors s'expressen com a mitjana ± error estàndard de 7 animals per grup. ANOVA 1 ($p < 0.05$): S, efecte de sexe; D, efecte de la HFD, S*D, efecte interactiu sexe i HFD, NS, no hi ha efecte significatiu. T-test ($p < 0.05$): *a*, femelles vs mascles; *b*, HFD vs control. ANOVA 2 ($p < 0.05$): S, efecte de sexe; R, efecte de la Rsg, S*R, efecte interactiu sexe i Rsg. T-test ($p < 0.05$): *a*, femelles vs mascles; *c*, HFD+Rsg vs HFD.

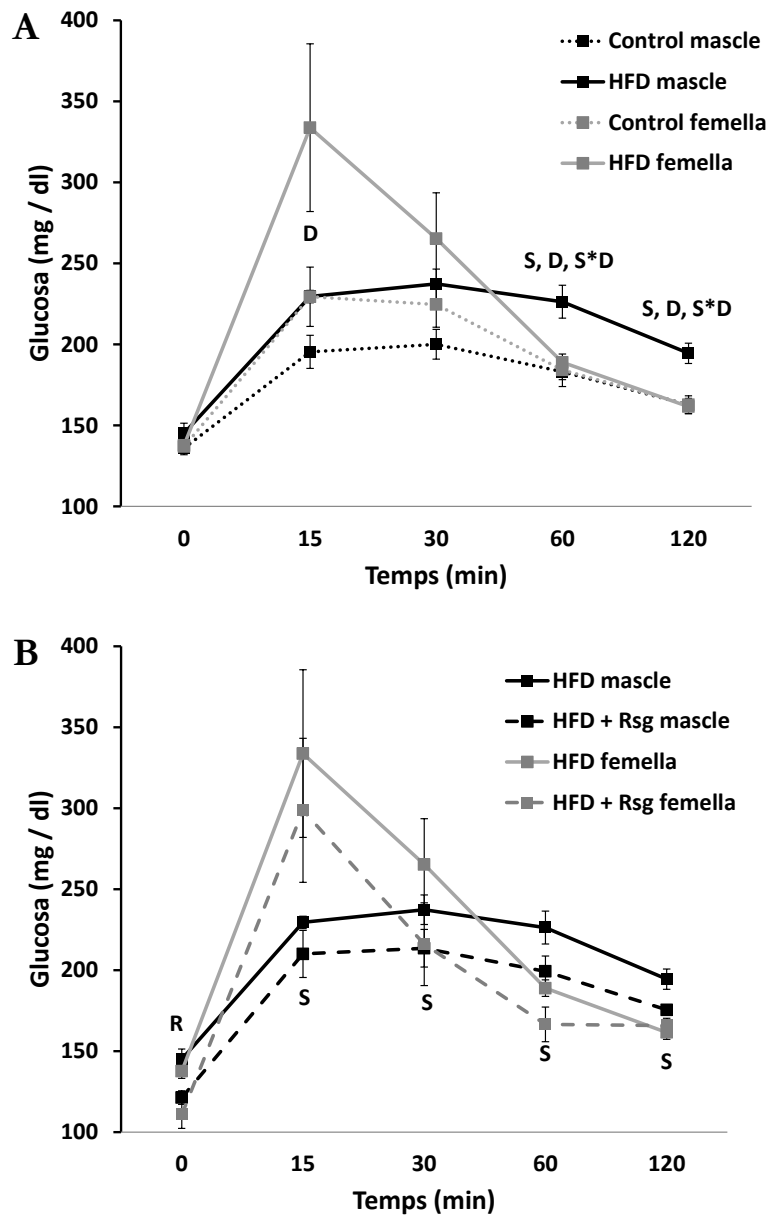


Figura 21. Efecte de la HFD (A) i del tractament amb Rsg (B) sobre les corbes de tolerància a la glucosa. HFD, dieta hiperlipídica; Rsg, rosiglitazona. Els valors s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de 7 animals per grup. A) ANOVA 1 ($p < 0.05$): S, efecte de sexe; D, efecte de la HFD, S*D, efecte interactiu sexe i HFD. B) ANOVA 2 ($p < 0.05$): S, efecte de sexe; R, efecte de la Rsg, S*R, efecte interactiu sexe i Rsg.

Efecte de la HFD i el tractament amb Rsg sobre marcadors cardíacs del metabolisme lipídic i glucídic i de la biogènesi i la funció mitocondrials

L'expressió cardíaca de PPAR α , PGC-1 α , PDK4, CD36, CPT1 i MCAD, així com els nivells de mtDNA, es varen incrementar als dos sexes en resposta a l'alimentació amb la HFD (fig. 22). En el cas del PPAR α i la PDK4, les seves expressions varen ser majors als mascles que a les femelles. Els nivells de mRNA per la perilipina V varen augmentar amb la HFD únicament a les femelles. El tractament dietètic va incrementar el contingut de TG al cor, però de forma més accentuada als mascles. Els nivells proteics de TFAM i COX IV, així com les activitats CS i COX, no es varen veure afectats pel tractament amb HFD.

Encara que el tractament amb Rsg va reduir el contingut cardíac en TG i els nivells de mRNA pel PPAR α i la PDK4 als dos sexes, les femelles varen assolir menors nivells que els mascles. La Rsg va incrementar l'expressió de MCAD i perilipina V, la qual va ser major a les femelles que als mascles. En resposta al tractament amb Rsg, només les femelles varen mostrar una disminució de l'expressió de CD36 i CPT1, uns nivells majors de mtDNA, un increment dels nivells proteics de TFAM i COX IV, i una major activitat COX. Als dos sexes, la Rsg va disminuir l'expressió del PGC-1 α i va augmentar l'activitat CS.

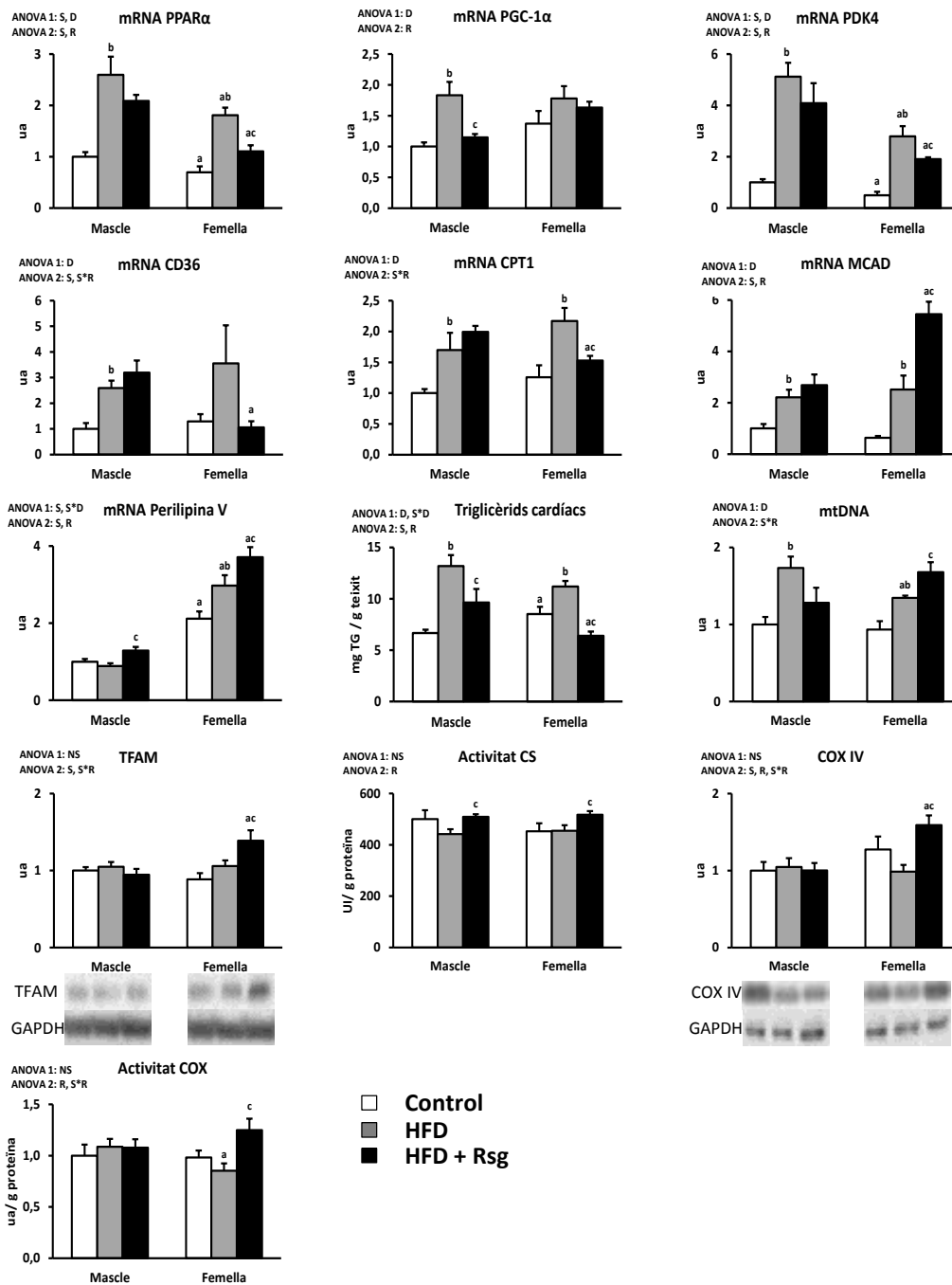


Figura 22. Efecte de la HFD i del tractament amb Rsg sobre marcadors cardíacs del metabolisme lipídic i glucídic i de la biogènesi i la funció mitocondrials. HFD, dieta hiperlipídica; Rsg, rosiglitazona; PPAR α , receptor activat per proliferadors peroxisomals α ; PGC-1 α , coactivador 1 α del receptor activat per proliferadors peroxisomals γ ; PDK4, cinasa 4 de la piruvat deshidrogenasa; CD36, clúster de diferenciació 36; CPT1, transferasa 1 de palmitoilcarnitina; MCAD, deshidrogenasa d'acils-CoA de cadena mitjana; mtDNA, DNA mitocondrial; TFAM (25 kDa), factor de transcripció mitocondrial A; CS, citrat sintasa; COX, citocrom c oxidasa; COX IV (16 kDa), subunitat IV de la COX. Els valors s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de 7 animals per grup. ANOVA 1 ($p < 0.05$): S, efecte de sexe; D, efecte de la HFD, S*D, efecte interactiu sexe i HFD, NS, no hi ha efecte significatiu. T-test ($p < 0.05$): a, femelles vs mascles; b, HFD vs control. ANOVA 2 ($p < 0.05$): S, efecte de sexe; R, efecte de la Rsg, S*R, efecte interactiu sexe i Rsg. T-test ($p < 0.05$): a, femelles vs mascles; c, HFD+Rsg vs HFD.

Efecte de la HFD i el tractament amb Rsg sobre marcadors cardíacs d'estrès oxidatiu

La dieta HFD va provocar un augment de les activitats GPx i SOD (fig. 23), les quals varen disminuir amb l'administració de Rsg. La TAC va disminuir en resposta a la HFD als dos sexes, mentre que els nivells proteics de PRX III només als mascles. La Rsg va incrementar els nivells de PRX III als dos sexes i la TAC i els nivells d'UCP3 només a les femelles. La HFD va augmentar el dany oxidatiu proteic únicament als mascles i la Rsg el va disminuir als dos sexes. Els nivells de 4HNE no varen variar als diferents grups experimentals.

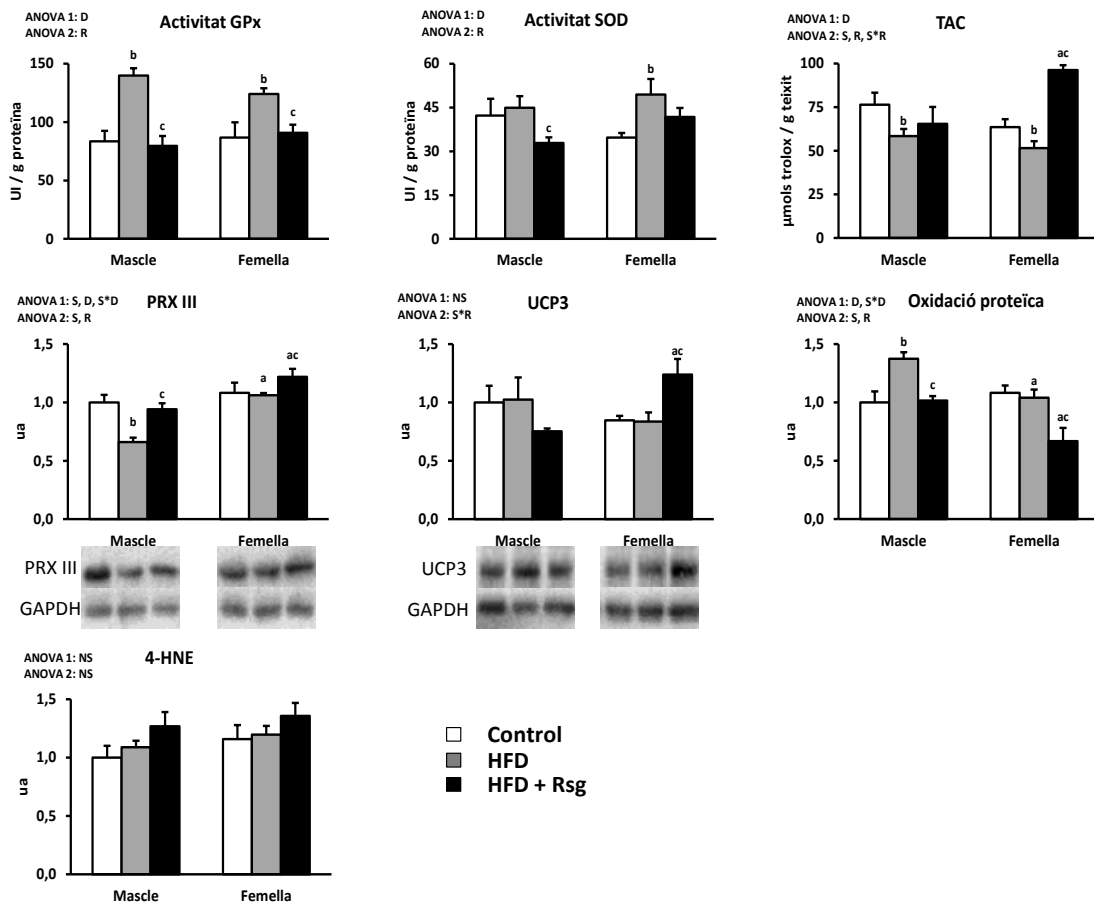


Figura 23. Efecte de la HFD i del tractament amb Rsg sobre marcadors cardíacs d'estrès oxidatiu. HFD, dieta hiperlipídica; Rsg, rosiglitazona; GPx, glutatió peroxidasa; SOD, superòxid dismutasa; TAC, capacitat antioxidant no enzimàtica total; PRX III (26 kDa), peroxiredoxina III; UCP3 (32 kDa), proteïna desacoblant 3; 4HNE, 4-hidroxinonenal. Els valors s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de 7 animals per grup. ANOVA 1 ($p < 0.05$): S, efecte de sexe; D, efecte de la HFD, S*D, efecte interactiu sexe i HFD, NS, no hi ha efecte significatiu. T-test ($p < 0.05$): a, femelles vs mascles; b, HFD vs control. ANOVA 2 ($p < 0.05$): S, efecte de sexe; R, efecte de la Rsg, S*R, efecte interactiu sexe i Rsg, NS, no hi ha efecte significatiu. T-test ($p < 0.05$): a, femelles vs mascles; c, HFD+Rsg vs HFD.

Efecte del palmitat i l'estradiol sobre marcadors de funció i biogènesi mitocondrials i d'estrès oxidatiu a cardiomiòcits H9c2

El tractament amb PA va provocar una disminució dels nivells proteics de PGC-1 α , COX IV, TFAM i Mn SOD (fig. 24), la qual va ser revertida per l'E₂ en el cas del PGC-1 α i la COX IV. Els nivells de PRX III es varen incrementar amb el tractament amb E₂ però no es varen alterar per efecte del PA. L'E₂ va reduir parcialment el dany oxidatiu proteic causat pel PA.

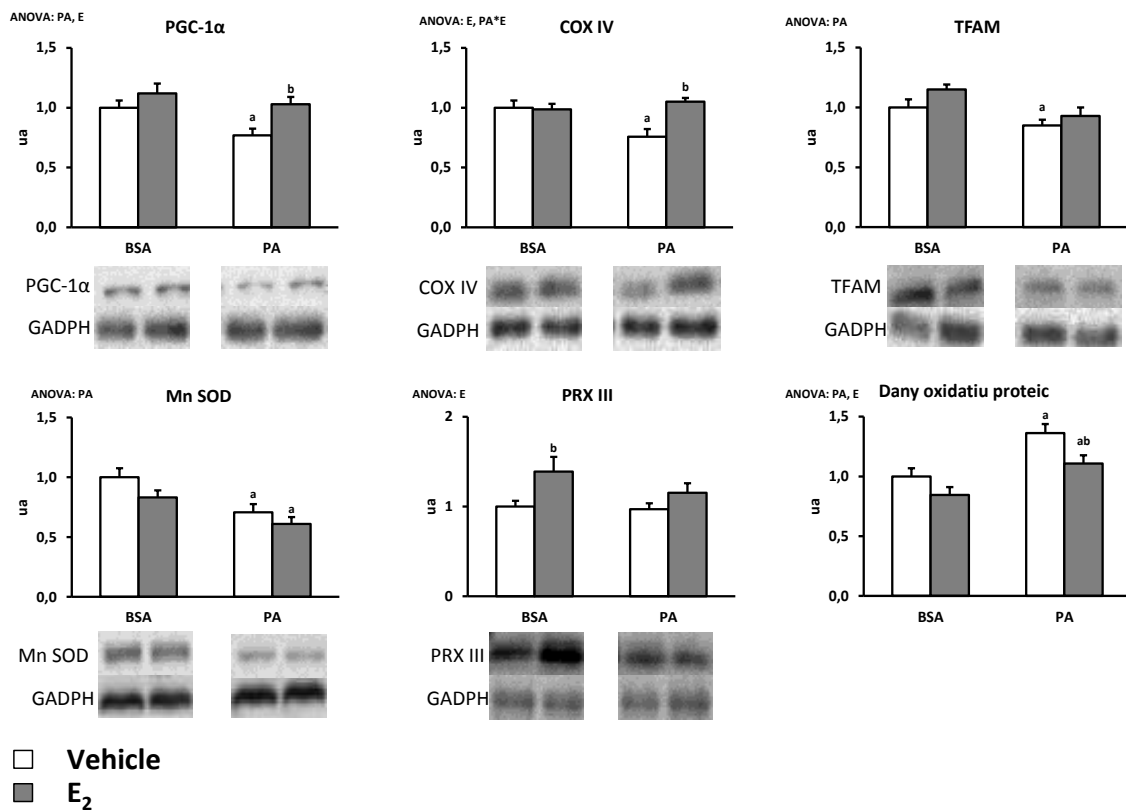


Figura 24. Efecte del palmitat i de l'estradiol sobre marcadors de funció i biogènesi mitocondrials i d'estrès oxidatiu a cardiomiòcits H9c2. PA, palmitat; E₂, 17beta-estradiol; PGC-1 α (90 kDa), coactivador 1 α del receptor activat per proliferadors peroxisomals γ ; COX IV (16 kDa), subunitat IV de la citocrom c oxidasa; TFAM (25 kDa), factor de transcripció mitocondrial A; SOD (25 kDa), superòxid dismutasa; PRX III (26 kDa), peroxiredoxina III. Les cèl·lules varen ser tractades amb PA (0.1 mM) o amb BSA (vehicle del PA) en combinació amb E₂ (10 nM) durant 20h. Els valors s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de dos experiments duts a terme per triplicat (n=6). Les diferències estadísticament significatives varen ser determinades mitjançant un ANOVA (p<0.05): PA, efecte del PA; E, efecte de l'E₂; PA*E₂, efecte PA i E₂. T-test (p<0.05): a, PA vs BSA, b, E₂ vs vehicle.

Efecte de la HFD i el tractament amb Rsg sobre elements de la via de senyalització de l'adiponectina i la insulina al cor

Amb la ingesta de la HFD varen disminuir els nivells proteics de T-cad, APPL1, AdipoR1 i LKB1 (fig. 25A), encara que en el cas d'aquestes dues darreres proteïnes únicament als mascles. Als grup HFD, l'AMPK va estar més activada a les femelles que als mascles. La Rsg va revertir els efectes de la HFD sobre els nivells de T-cad i APPL1, i va incrementar la fosforilació de l'AMPK als dos sexes, encara que aquesta cinasa va seguir més activada a les femelles. Els nivells d'AdipoR1 no es varen modificar en resposta a la Rsg i es varen mantenir més elevats a les femelles. La fosforilació de l'Akt estimulada per la insulina no es va veure afectada per la HFD (fig. 25B), i es va incrementar en resposta a la Rsg únicament a les femelles.

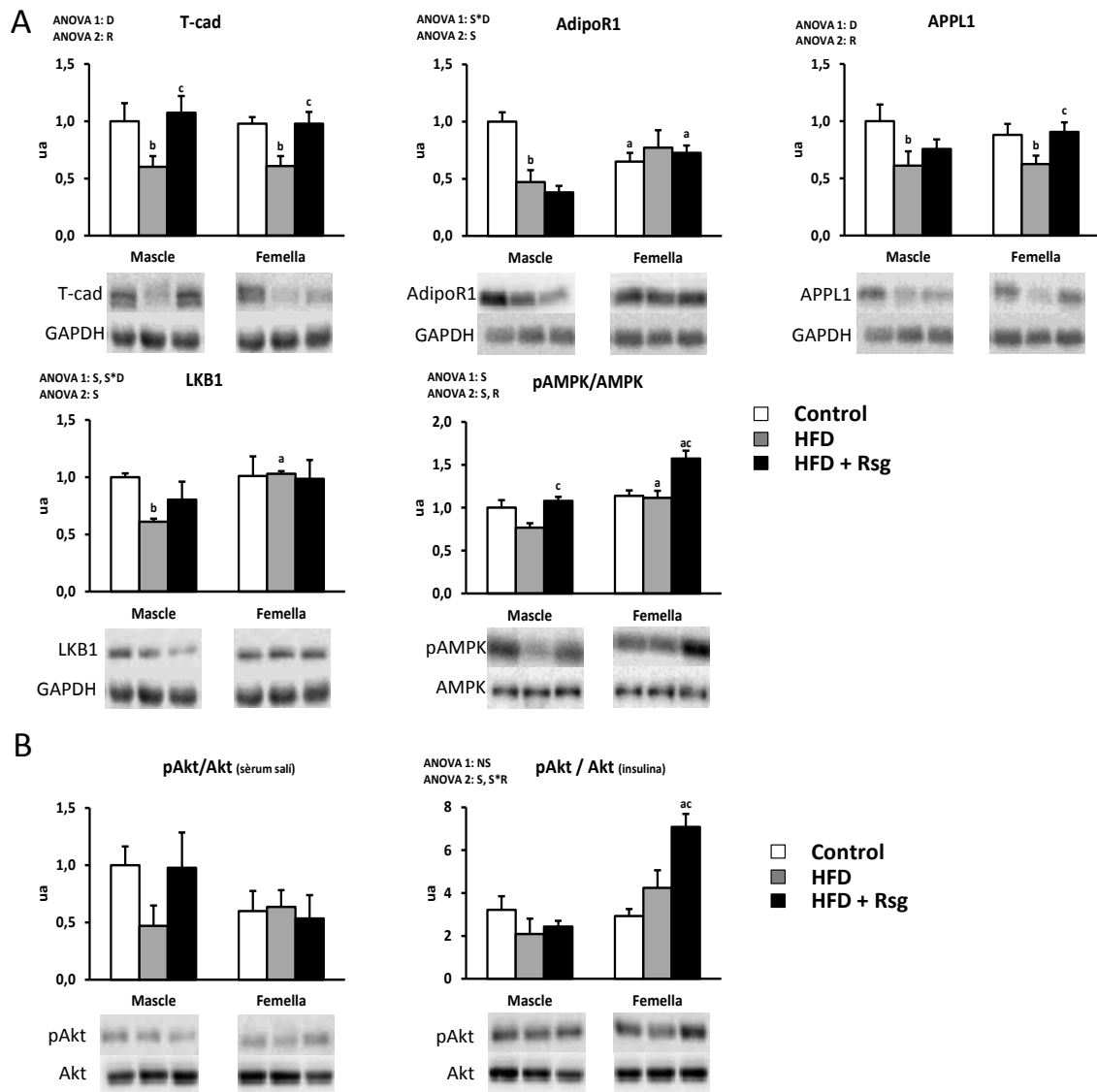


Figura 25. Efecte de la HFD i del tractament amb Rsg sobre elements de la via de senyalització de l'adiponectina (A) i la insulina (B) al cor. HFD, dieta hiperlipídica; Rsg, rosiglitazona; AdipoR1 (43 kDa), receptor 1 de l'adiponectina; Akt (60 kDa), proteïna cinasa B, AMPK (63 kDa), cinasa activada per AMP; APPL1 (82 kDa), proteïna adaptadora 1 que conté una interacció de fosfotirosines, un domini PH i una cremallera de leucina; LKB1 (54 kDa), cinasa B1 del fetge; T-cad (105-130 kDa), T-cadherina; A l'estudi de la via de senyalització a la insulina (B), s'administrà insulina 5 U/kg o vehicle (sèrum salí) a la meitat dels animals 20 minuts abans del seu sacrifici. Els valors s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de 7 animals per grup. ANOVA 1 ($p < 0.05$): S, efecte de sexe; D, efecte de la HFD; S*D, efecte interactiu sexe i HFD; NS, no hi ha efecte significatiu. T-test ($p < 0.05$): a, femelles vs mascles; b, HFD vs control. ANOVA 2 ($p < 0.05$): S, efecte de sexe; R, efecte de la Rsg, S*R, efecte interactiu sexe i Rsg; NS, no hi ha efecte significatiu. T-test ($p < 0.05$): a, femelles vs mascles; c, HFD+Rsg vs HFD.

Efecte del palmitat i l'estradiol sobre elements de la via de senyalització de l'adiponectina a cardiomiòcits H9c2

El tractament amb PA va disminuir els nivells proteics de T-cad i APPL1 (fig. 26A), mentre que l'E₂ va augmentar els nivells de T-cad. L'E₂ va incrementar la fosforilació de l'AMPK (fig. 26B) i aquest efecte no va ser modificat pel PA i es va mantenir en presència d'adiponectina.

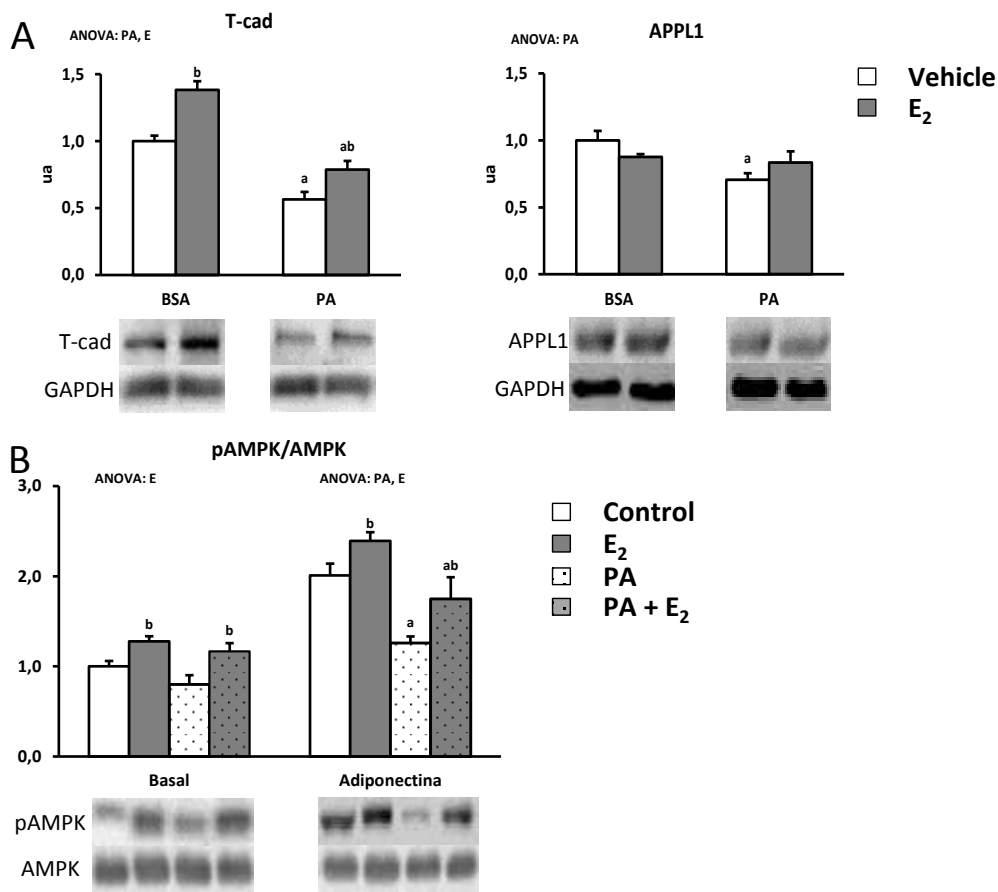


Figura 26. Efecte del palmitat i l'estradiol sobre elements de la via de senyalització de l'adiponectina a cardiomiòcits H9c2. PA, palmitat; E₂, 17β-estradiol; AMPK (63 kDa), cinasa activada per AMP, APPL1 (82 kDa), proteïna adaptadora 1 que conté una interacció de fosfotirosines, un domini PH i una cremallera de leucina; T-cad (105-130 kDa), T-cadherina. Les cèl·lules H9c2 varen ser tractades amb PA (0.1 mM) o amb BSA (vehicle del PA) en combinació amb E₂ (10 nM) durant 20h. B) Abans de recollir, les cèl·lules varen ser estimulades amb adiponectina (1,5 µg/µl) durant 15 minuts. Els valors s'expressen com a mitjana ± error estàndard de dos experiments duts a terme per triplicat (n=6). Les diferències estadísticament significatives varen ser determinades amb un ANOVA (p<0.05): PA, efecte del PA; E, efecte de l'E₂; T-test (p<0.05): a, PA vs BSA, b, E₂ vs vehicle.

4.2.2. Discussió

L'increment dels lípids sèrics associat a una HFD origina un fenotip lipotòxic al cor que pot provocar un deteriorament progressiu de la funció cardíaca (Sung et al., 2015). En el present estudi hem observat que les rates femella tenen una major resistència a la disfunció metabòlica lipotòxica induïda amb l'alimentació amb una HFD, així com una major resposta d'aquest sexe als efectes beneficiosos de l'administració de Rsg sobre la lipotoxicitat cardíaca. L'E₂ podria ser responsable, almenys en part, d'aquest dimorfisme sexual a través de l'activació de l'AMPK cardíaca en un entorn lipotòxic.

La HFD va disminuir la tolerància a la glucosa únicament als mascles, els quals varen presentar també un major increment de l'índex d'adipositat. A més, alguns indicadors de resistència a la insulina, com l'HOMA-IR, la insulinèmia en dejú i l'índex leptina/adiponectina (Oda et al., 2008), varen ser també més elevats en aquest sexe. Aquests resultats suggereixen que els efectes de la HFD incrementant la resistència sistèmica a la insulina varen ser més accentuats als mascles. El fet de trobar-se en una situació de menor sensibilitat a la insulina va provocar, possiblement, una major resposta dels mascles a la Rsg disminuint la resistència a la insulina en comparació a les femelles.

L'augment de la lipèmia observada en resposta a l'alimentació amb una HFD podria associar-se a una major captació i oxidació cardíaca d'àcids grassos, com ho suggereixen les expressions de CD36, CPT1 i MCAD. L'increment del metabolisme lipídic origina una disminució de l'ús de glucosa (Bayeva et al., 2013). En aquest sentit, es va observar un dimorfisme sexual en l'expressió de la PDK4, un inhibidor de la piruvat deshidrogenasa, suggerint un major ús de glucosa al cor de les femelles respecte als dels mascles, la qual cosa estaria d'acord amb el menor increment de la lipèmia i amb la menor resistència a la insulina observats a les femelles en resposta a l'alimentació amb la HFD. Les hormones sexuals podrien ser responsables d'aquest dimorfisme ja que s'ha

vist un efecte hiperlipemiant dels andrògens (Tepavčević et al., 2014) i una estimulació de la captació cardíaca de glucosa per part de l'E₂ (Arias-Loza et al., 2012). El menor ús de glucosa en resposta a la HFD no va anar acompanyat d'una reducció en la sensibilitat cardíaca a la insulina, tal i com ho reflecteix la fosforilació de l'Akt estimulada per aquesta hormona. Aquests resultats suggereixen que els cors es trobaven en una fase inicial de lipotoxicitat cardíaca ja que s'ha descrit que l'augment de la PDK4 precedeix el desenvolupament de resistència a la insulina (Crewe et al., 2013). El canvi del perfil metabòlic cap a una major oxidació lipídica està modulada pel PPAR α i pel PGC-1 α (Schilling, 2015). Es va observar que les rates mascle presentaven majors nivells de mRNA pel PPAR α que les femelles, la qual cosa explicaria la seva major expressió PDK4, ja que el PPAR α provoca una disminució de l'ús de glucosa (Finck et al., 2002). La captació d'àcids grassos possiblement va superar la seva oxidació i, consegüentment, es varen incrementar els nivells de TG cardíacs, fenotip que és característic de la lipotoxicitat cardíaca (Fillmore et al., 2014; Sung et al., 2015). Altra vegada, però, aquest increment del contingut lipídic cardíac va ser menor a les rates femella, la qual cosa, juntament amb una major utilització cardíaca de glucosa, suggereix que els efectes de l'alimentació amb una HFD sobre la lipotoxicitat cardíaca són menys perjudicials en aquest sexe.

Com a estratègia per afrontar a major β -oxidació causada per la major disponibilitat de combustibles lipídics, la HFD va provocar un augment del contingut mitocondrial. No obstant això, les activitats CS i COX, així com els nivells de COX IV, no s'alteraren amb la HFD, indicant que, malgrat aquest increment de la β -oxidació, no es va produir un augment paral·lel de l'activitat del cicle de Krebs ni de la cadena de transport electrònic (ETC). El desequilibri entre aquests processos mitocondrials produeix una major formació de ROS a través de l'ETC (Lorenzo et al., 2013). En aquest sentit, es va observar un increment de les defenses antioxidants enzimàtiques als dos

sexes, probablement per contrarestar aquest ambient pro-oxidant però, no obstant això, els mascles varen presentar un major dany oxidatiu proteic al cor. Donat que la perilipina V disminueix la producció cardíaca de ROS a través del segrest d'àcids grassos a les vesícules lipídiques i, per tant, disminuint la seva oxidació mitocondrial (Lorenzo et al., 2013), la major expressió de perilipina V a les rates HFD femella podria ser una resposta per prevenir el desenvolupament d'una lipotoxicitat al miocardi. En conjunt, aquests resultats suggereixen, de nou, un menor efecte de la HFD sobre la lipotoxicitat cardíaca a les rates femella.

En una primera etapa del desenvolupament de la lipotoxicitat cardíaca, els cardiomiòcits incrementen la biogènesi mitocondrial per afrontar l'augment del metabolisme lipídic. Ara bé, aquest canvi metabòlic comporta una major producció de ROS, de manera que la lipotoxicitat desemboca finalment en una disfunció mitocondrial (Schilling, 2015). Tenint en compte que l'E₂ incrementa la funció i la biogènesi mitocondrials i redueix l'estrès oxidatiu al cor (veure secció 4.1), ens proposarem investigar si els efectes d'aquesta hormona es mantenen en condicions de lipotoxicitat. Per analitzar-ho, cardiomiòcits H9c2 varen ser tractats amb PA per provocar lipotoxicitat i disfunció mitocondrial. Es va veure que els efectes del PA disminuint els nivells de marcadors de biogènesi mitocondrial i incrementant el dany oxidatiu proteic eren contrarestats parcialment mitjançant el tractament amb E₂. Aquests resultats reforcen la importància de l'E₂ com a modulador de la biogènesi mitocondrial i l'estrès oxidatiu cardíacs i suggereixen que aquests efectes de l'E₂ podrien ser rellevants durant una fase més avançada de la lipotoxicitat cardíaca en la qual el metabolisme energètic mitocondrial estaria compromès.

En aquest estudi es va veure que l'efecte hipolipemiant de la Rsg (Chaput et al., 2000) va igualar els nivells de TG i NEFAs circulants entre els dos sexes. No obstant, els nostres resultats suggereixen una disminució de la captació i

del transport mitocondrial d'àcids grassos al cor de les rates femella en resposta a la Rsg, però no així als mascles. Amb tot, les femelles varen incrementar l'expressió cardíaca de MCAD, indicant que, tot i rebre menors quantitats de lípids, els mitocondris cardíacs incrementaren la β -oxidació reduint així el contingut en TG al miocardi en resposta a la Rsg. Aquest increment de la β -oxidació seria paral·lel a una major biogènesi i funció mitocondrials al cor de les rates HFD+Rsg femella la qual cosa apunta a una oxidació lipídica més eficient en aquest òrgan. D'aquesta manera, la millora de l'oxidació lipídica a les rates femella en resposta a la Rsg suposa un mecanisme de protecció per disminuir la formació de ROS i d'intermediaris lipídics tòxics, de manera que disminuiria la lipotoxicitat cardíaca. En aquest sentit, aquest perfil del metabolisme lipídic de les rates femella tractades amb Rsg va anar acompanyat per un increment de la TAC i dels nivells d'UCP3 i, conseqüentment, d'un menor dany oxidatiu. Tenint en compte els efectes de l'E₂ disminuint l'estrès oxidatiu al cor de rates ovariectomitzades a través de l'increment de la UCP2 i la UCP3 (veure secció 4.1), els resultats del present estudi reforcen el rol de les UCPs en els mecanismes que modulen els efectes antioxidants de l'E₂ al cor. A més, encara que la Rsg va provocar una disminució de l'expressió de PDK4, aquesta es va mantenir més baixa a les femelles, la qual cosa va contribuir, possiblement, a l'increment de la sensibilitat a la insulina observada únicament en aquest sexe.

L'AMPK és un element clau en el control del metabolisme dels cardiomiòcits ja que, entre altres efectes, incrementa l'oxidació glucídica i lipídica (Towler and Hardie, 2007), i, a més, té efectes antioxidants importants (Barreto-Torres et al., 2015). Per tant, la major activació de l'AMPK observada al cor de les rates HFD femella respecte el dels mascles permetria explicar, almenys en part, la menor inhibició de l'ús de glucosa i el menor dany oxidatiu proteic en aquest sexe. Aquesta major activació de l'AMPK cardíaca a les femelles es podria deure als seus majors nivells sèrics d'adiponectina, ja que aquesta

adipoquina és un dels principals activadors de l'AMPK (Lopaschuk et al., 2010), així com a un menor efecte deleteri de la HFD sobre els elements clau de la via de senyalització de l'adiponectina al cor. Aquest darrer efecte podria ser degut a l'E₂, el qual va contrarestar la reducció provocada pel PA sobre els nivells de proteïnes que pertanyen a aquesta via de senyalització a cardiomiòcits H9c2. El fet que s'hagin observat efectes similars de l'E₂ al múscul esquelètic de rates ovariectomitzades i a miòcits L6E9 (Capllonch-Amer et al., 2014b), suggereix que l'E₂ potencia l'expressió de les proteïnes implicades en la senyalització de l'adiponectina a ambdós tipus de teixits musculars. A més, la major activació de l'AMPK al cor de les rates femella podria deure's a un efecte directe de l'E₂, el qual va activar aquesta cinasa a cardiomiòcits H9c2, com ja ha sigut descrit a ratolins ovariectomitzats (Turdi et al., 2014), i aquest efecte es va mantenir en condicions de lipotoxicitat originades amb PA. Per tant, l'E₂ de manera directa, juntament amb uns majors nivells d'adiponectina i dels elements de la seva via, contribuiria a la major activació de l'AMPK al cor de les rates femella i, conseqüentment, a la seva major resistència a desenvolupar lipotoxicitat cardíaca induïda per l'alimentació amb la HFD. D'altra banda en resposta a l'administració de Rsg es varen incrementar i igualar els nivells d'adiponectina entre ambdós sexes, així com també els elements de la seva via de senyalització al miocardi, apuntant a que aquests paràmetres no varen contribuir a la major activació de l'AMPK al cor de les rates femella tractades amb Rsg respecte als mascles. No obstant, als cardiomiòcits H9c2 es va veure que l'activació de l'AMPK per part de l'E₂ en un entorn lipotòxic es va mantenir en presència de l'adiponectina, suggerint un efecte complementari d'aquests dos activadors sobre l'AMPK cardíaca. Per tant, aquests resultats apunten a que l'E₂ va ser responsable, almenys en part, de la major activació de l'AMPK cardíaca a les femelles en comparació als mascles en resposta al tractament amb Rsg, de manera que aquesta hormona contribuiria a incrementar la resposta a aquest tractament farmacològic.

En resum, els nostres resultats suggereixen que el cor de les rates femella, en comparació amb el dels mascles, té una major capacitat d'adaptació al canvi del perfil metabòlic causat per una HFD, de forma que presenta menor lipotoxicitat cardíaca. A més, en resposta al tractament amb Rsg, la reducció d'aquesta lipotoxicitat és major al cor de les rates femella. Una major activació de l'AMPK cardíaca a les femelles podria ser responsable d'aquest dimorfisme sexual en la resposta a la HFD i a la Rsg. En aquest sentit, l'E₂ incrementa l'activació de l'AMPK a cardiomiòcits en condicions lipotòxiques, suggerint que aquesta hormona tindria un rol protector reduint les complicacions cardíques en l'obesitat. Aquest dimorfisme sexual en el metabolisme cardíac en condicions lipotòxiques hauria de ser un factor a tenir en compte en el disseny d'estratègies terapèutiques per a les cardiomiopaties.

4.3. Efectes de l'estradiol i l'AMPK sobre les vies inflamàtòries de les MAPKs a cardiomiòcits en condicions de lipotoxicitat

La lipotoxicitat cardíaca suposa una disfunció metabòlica que provoca l'activació de les vies inflamàtòries, entre elles les MAPKs (Li, 2013; Palomer et al., 2013; Liu et al., 2015). S'ha vist que els estrògens disminueixen la senyalització de les MAPKs p38 (Kim et al., 2006) i JNK (Liu et al., 2009; Wang et al., 2015b) a cardiomiòcits. A més, aquestes hormones poden activar l'AMPK cardíaca (Turdi et al., 2014), mantenint aquest efecte en condicions de lipotoxicitat (veure apartat 4.2). L'AMPK és una proteïna clau en el control del metabolisme energètic i, a més, redueix la resposta inflamatòria provocada pel palmitat (PA) a cardiomiòcits (Haffar et al., 2015).

Tenint en compte aquests antecedents, l'objectiu d'aquest estudi va ser determinar si els efectes de l'E₂ disminuint l'activació de les MAPKs en condicions lipotòxiques eren dependents de l'activació de l'AMPK per part d'aquesta hormona. Per aquest propòsit, s'utilitzaren cardiomiòcits H9c2 i es varen activar les vies inflamàtòries mitjançant el tractament amb PA. Per comprovar els efectes de l'AMPK atenuant l'activació de les MAPKs, les cèl·lules varen ser tractades amb A769662, un activador de l'AMPK. Es va analitzar també si l'E₂ disminuïa l'activació d'aquestes vies i si aquest efecte es mantenia en presència del compost c, un inhibidor de l'AMPK.

4.3.1. Resultats

Efecte del palmitat i A769662 sobre les vies de les MAPKs a cardiomiòcits H9c2

A769662 va incrementar la fosforilació de l'ACC, una de les principals dianes de l'AMPK (Coort et al., 2007) (fig. 27), confirmant-se els efectes activadors que té aquest compost sobre aquesta cinasa. El tractament amb PA també va augmentar la fosforilació de l'ACC, així com la de JNK i ERK, efecte que en aquestes dues cinases va ser parcialment revertit amb el compost A769662.

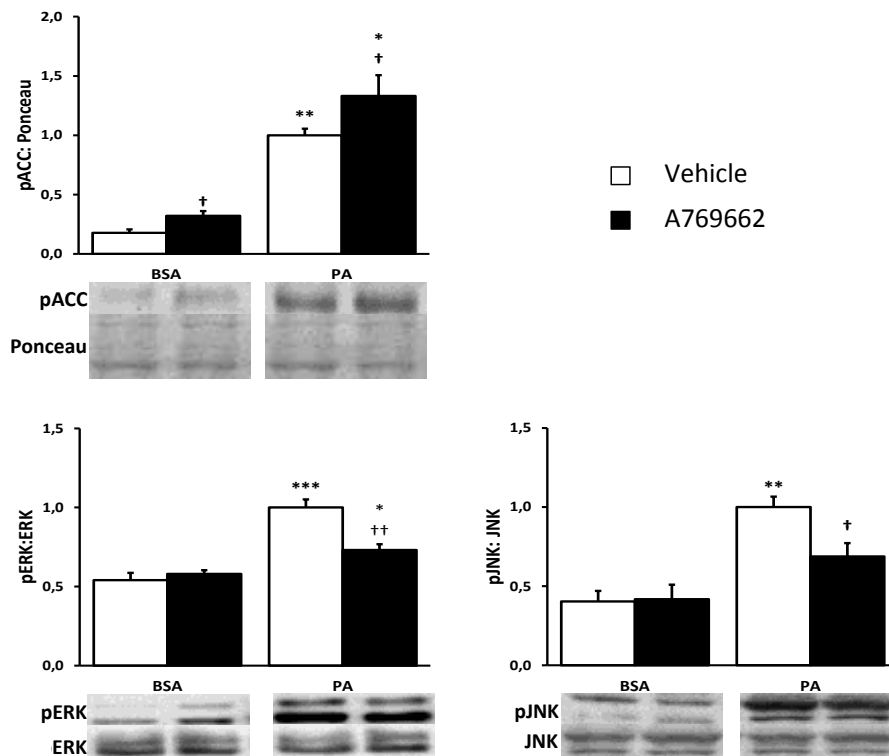


Figura 27. Efecte del palmitat i A769662 sobre la fosforilació de l'ACC i de les vies de les MAPKs a cardiomiòcits H9c2. PA, palmitat; ACC (280 kDa), acetil-CoA carboxilasa; ERK (42-44 kDa), cinasa regulada per senyals extracel·lulars; JNK (46-54 kDa), cinasa de l'extrem N-terminal de c-Jun. Les cèl·lules varen ser tractades amb PA (0.1 mM) o amb BSA (vehicle del PA) en combinació amb A769662 –activador de l'AMPK- (10 μ M) o el seu vehicle (DMSO) durant 20 hores. Els valors s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de dos experiments duts a terme per duplicat (n=4). Les diferències estadísticament significatives varen ser determinades mitjançant un test t de Student: * $p < 0.05$ en relació al BSA, ** $p < 0.01$ en relació al BSA, *** $p < 0.001$ en relació al BSA, † $p < 0.05$ en relació al vehicle, †† $p < 0.01$ en relació al vehicle.

Efecte del palmitat, l'estradiol i el compost c sobre l'activació de l'AMPK i de les vies de les MAPKs a cardiomiòcits H9c2

L'E₂ va incrementar la fosforilació de l'AMPK i l'ACC (fig. 28) i aquest efecte va ser contrarestat en presència del compost c, comprovant-se així els efectes inhibidors d'aquest compost sobre l'AMPK. La major fosforilació d'ERK, p38 i JNK degut al PA no es va veure afectada pel compost c. En canvi, en presència d'E₂, l'efecte del PA sobre l'activació d'aquestes MAPKs va ser menor, i es mantingué en presència de compost c.

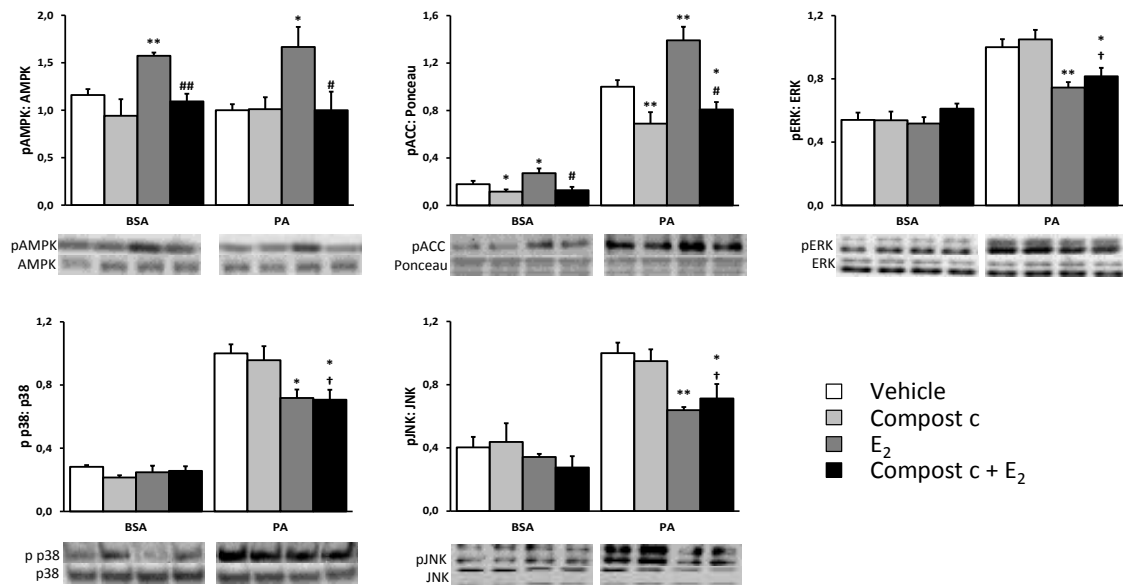


Figura 28. Efecte del palmitat, l'estradiol i el compost c sobre l'activació de l'AMPK i de les vies de les MAPKs a cardiomiòcits H9c2. E₂, 17beta-estradiol; PA, palmitat; AMPK (63 kDa), cinasa activada per AMP; ACC (280 kDa), acetil-CoA carboxilasa; ERK (42-44 kDa), cinasa regulada per senyals extracel·lulars; JNK (46-54 kDa), cinasa de l'extrem N-terminal de c-Jun. Les cèl·lules varen ser tractades amb PA (0.1 mM) o amb BSA (vehicle del PA) en combinació amb E₂ (10 nM) i/o compost c –inhibidor d'AMPK– (1 μM) durant 20 hores. Els valors s'expressen com a mitjana ± error estàndard de tres experiments duts a terme per duplicat (n=6). Les diferències estadísticament significatives varen ser determinades mitjançant un test t de Student: * p < 0.05 en relació al vehicle, ** p < 0.01 en relació al vehicle, # p < 0.05 en relació a l'E₂, ## p < 0.01 en relació a l'E₂, † p < 0.05 en relació al compost c.

Efecte del palmitat, A769662, l'estradiol i el compost c sobre la viabilitat cel·lular dels cardiomiòcits H9c2

El tractament amb BSA, vehicle del PA, no va afectar a la viabilitat dels cardiomiòcits H9c2 (fig. 29). En canvi, el PA va provocar una disminució d'aproximadament un 30% de les cèl·lules viables, posant de manifest el seu efecte lipotòxic. Ni A769662 (fig. 29A) ni l'E₂ i/o el compost c (fig. 29B) varen provocar una disminució de la viabilitat cel·lular.

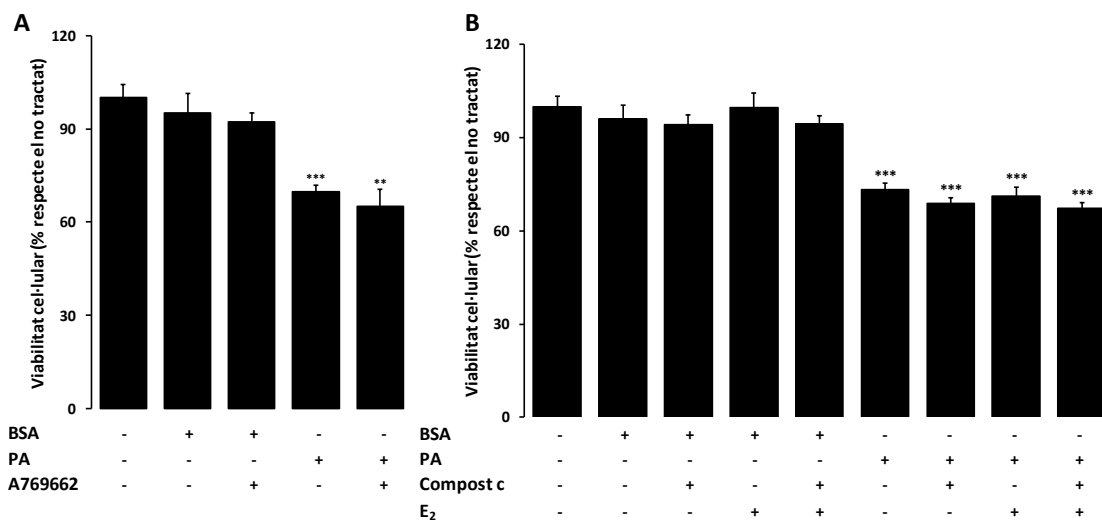


Figura 29. Efecte del palmitat i A76966 (A) i del palmitat, l'estradiol i el compost c (B) sobre la viabilitat cel·lular a cardiomiòcits H9c2. E₂, 17beta-estradiol; PA, palmitat. Les cèl·lules varen ser tractades amb PA (0.1 mM) o amb BSA (vehicle del PA) en combinació amb A769662 –activador de l'AMPK– (10 µM) (A) o PA en combinació amb E₂ (10 nM) i/o compost c –inhibidor d'AMPK– (1 µM) (B) durant 20 hores. Els valors s'expressen com a mitjana ± error estàndard de dos experiments duts a terme per triplicat (n=6). Les diferències estadísticament significatives varen ser determinades mitjançant un test t de Student: ** p < 0.01 en relació al BSA, *** p < 0.001 en relació al BSA.

4.3.2. Discussió

Als cardiomiòcits, en resposta a una sobrecàrrega de lípids, s'incrementa la formació de ROS i, en conseqüència, s'activen les MAPKs (Liu et al., 2015). Aquestes vies inflammatòries promouen el desenvolupament de la resistència cardíaca a la insulina, la hipertròfia i l'apoptosi, originant un fenotip que pot desembocar en insuficiència cardíaca (Li, 2013; Palomer et al., 2013). En aquest estudi es va posar de manifest que l'AMPK redueix l'activació de les MAPKs a cardiomiòcits en resposta a condicions lipotòxiques induïdes amb PA. Encara que l'E₂ va tenir també un efecte antiinflamatori i va activar a l'AMPK, els seus efectes sobre les MAPKs es varen mantenir quan es va inactivar l'AMPK, apuntant a que els mecanismes antiinflamatoris de l'E₂ sobre les MAPKs a cardiomiòcits són independents de l'AMPK.

Està amplament acceptat que l'AMPK és un potent activador del catabolisme cel·lular (Towler and Hardie, 2007), i més recentment s'ha descrit el seu rol com a element inflamatori en una gran varietat de tipus cel·lulars (Salt and Palmer, 2012). Per exemple, a cardiomiòcits tractats amb PA, l'activació de l'AMPK redueix la síntesi de citocines proinflamatòries promoguda per aquest àcid gras (Haffar et al., 2015). D'entre els mecanismes antiinflamatoris de l'AMPK cal destacar la inhibició de les vies de les MAPKs (Salt and Palmer, 2012). En aquest estudi s'ha vist que l'activació de l'AMPK mitjançant A769662 disminueix l'efecte activador del PA sobre ERK i JNK a cardiomiòcits H9c₂, la qual cosa confirma els efectes antiinflamatoris d'aquesta cinasa en la lipotoxicitat cardíaca.

Els estrògens tenen la capacitat de disminuir la inflamació provocada per la disfunció metabòlica associada a l'obesitat (Monteiro et al., 2014). D'acord amb aquest fet, s'ha descrit que l'ovariectomia provoca un increment de la producció cardíaca de citocines proinflamatòries (Pavón et al., 2012) i que el tractament amb E₂ disminueix l'activació de JNK estimulada pel

lipopolisacàrid (LPS) a cardiomiòcits H9c2 (Fan et al., 2014). No obstant, els efectes dels estrògens sobre la inflamació cardíaca en condicions lipotòxiques no havien estat encara dilucidats. En aquest estudi s'ha vist com l'E₂ disminueix l'activació de JNK, p38 i ERK promoguda pel tractament amb PA. Aquests resultats suggereixen un rol antiinflamatori dels estrògens en la lipotoxicitat cardíaca i reforcen el paper beneficiós de l'E₂ al cor lipotòxic, ja que també s'ha vist que millora el perfil metabòlic, l'estrès oxidatiu i la funció mitocondrial (veure apartat 4.2).

Estudis previs mostren que l'ovariectomia provoca una menor activació de l'AMPK al miocardi, efecte que és revertit amb l'administració d'E₂ (Turdi et al., 2014). A més, aquest efecte activador de l'E₂ sobre l'AMPK es manté en condicions de lipotoxicitat (veure apartat 4.2), de manera que la inhibició de les MAPKs als cardiomiòcits per part de l'E₂ podria implicar un mecanisme dependent de l'activació de l'AMPK. Per comprovar aquesta connexió E₂-AMPK-MAPKs, es varen tractar els cardiomiòcits H9c2 amb PA i E₂, en presència de compost c per inhibir l'AMPK. Es va veure com els efectes de l'E₂ atenuant l'activació de JNK, p38 i ERK promoguda pel PA es mantenien quan l'AMPK es trobava inhibida, la qual cosa suggereix que, tot i que l'E₂ activa a l'AMPK, els efectes d'aquesta hormona sobre les vies de les MAPKs a cardiomiòcits en condicions de lipotoxicitat no depenen de l'activació de l'AMPK.

Malgrat la manca de dependència entre els efectes de l'E₂ i l'AMPK sobre les MAPKs, no es pot descartar que hi hagi una connexió entre les dues vies a nivell d'elements *upstream* de les MAPKs. Així, en primer lloc cal destacar el receptor de tipus *Toll* 4 (TLR4), una proteïna clau en la inflamació del miocardi en condicions de lipotoxicitat i que, entre altres efectes, provoca l'activació de les MAPKs (Fuentes-Antràs et al., 2014). Atès que s'ha vist que l'E₂ disminueix l'expressió del TLR4 estimulada per LPS a cardiomiòcits, de manera que es redueix l'activació de JNK (Fan et al., 2014), es podria

especular que el PA activaria la senyalització TLR4-MAPK a cardiomiòcits i aquest efecte disminuiria en presència d'aquesta hormona. En aquest sentit, cal destacar que l'adiponectina, un dels principals activadors fisiològics de l'AMPK, inhibeix el TLR4 cardíac (Jenke et al., 2013), de manera que l'activació de l'AMPK podria atenuar la inflamació a través del TLR4. Així, la senyalització a través del TLR4 suposaria un punt comú d'inhibició de la inflamació per part de l'E₂ i l'AMPK. Un altre mecanisme inflamatori en comú d'ambdues vies podria implicar a la proteïna PI3K ja que s'ha vist que els efectes de l'E₂ disminuint l'activació de JNK estimulada per LPS a cardiomiòcits són revertits inhibint la PI3K (Liu et al., 2009), i que l'AMPK activa la via del PI3K (Tao et al., 2010). Per tant, la inhibició del TLR4 i l'activació de la via del PI3K podrien suposar dos punts de regulació de les MAPK compartits per l'E₂ i l'AMPK.

En resum, aquest estudi demostra que l'E₂ i l'AMPK poden disminuir la inflamació provocada pel PA a cardiomiòcits, reforçant el seu rol protector en la lipotoxicitat cardíaca (veure apartat 4.2) i la seva importància com a dianes terapèutiques per a tractar patologies inflamatòries. No obstant, encara que l'E₂ activa l'AMPK, sembla que els efectes antiinflamatoris d'aquesta hormona no requereixen l'activació d'aquesta cinasa, per la qual cosa és necessari desenvolupar més estudis per elucidar els mecanismes antiinflamatoris dels estrògens en la lipotoxicitat cardíaca.

4.4. Efectes de l'AMPK sobre les vies del NF- κ B i de les MAPKs a cèl·lules endotelials

L'estudi que es presenta en aquest apartat es va desenvolupar al *Institute of Cardiovascular and Medical Sciences* de la Universitat de Glasgow durant una estada predoctoral de tres mesos realitzada sota la direcció del Dr. Ian Salt. La investigació del grup del Dr. Salt està centrada en l'estudi de l'AMPK, una proteïna clau en la regulació del catabolisme cel·lular que recentment s'ha vist que també té efectes antiinflamatoris en una gran varietat de tipus cel·lulars. D'entre els mecanismes antiinflamatoris de l'AMPK destaquen la disminució de la formació de ROS, l'estimulació de la biogènesi mitocondrial, l'increment de la síntesi de citocines antiinflamatòries, la inhibició de la via JAK-STAT, l'atenuació de la via del NF- κ B i la inhibició de les MAPKs (Salt and Palmer, 2012). L'estudi realitzat durant aquesta estada predoctoral es va centrar en els efectes de l'AMPK sobre les vies del NF- κ B i de les MAPKs a cèl·lules endotelials, la inflamació de les quals origina disfunció endotelial, un esdeveniment associat al desenvolupament de la malaltia vascular.

S'han proposat diversos mecanismes a través dels quals l'AMPK atenua l'activació del factor de transcripció NF- κ B a cèl·lules endotelials. Per una banda, s'ha vist que l'AMPK inhibeix al coactivador transcripcional p300, de manera que disminueix la capacitat d'unió del NF- κ B al DNA (Zhang et al., 2011). D'altra banda, s'ha descrit que l'AMPK fosforila i inactiva a la IKK (Bess et al., 2011), un element *upstream* de la via del NF- κ B que inactiva a l'I κ B, el segrestador citoplasmàtic del NF- κ B (fig. 30). A més dels efectes sobre la via del NF- κ B, l'AMPK inhibeix les vies de les MAPKs p38 i JNK a cèl·lules endotelials (fig.21) (Dong et al., 2010) i a cardiomiòcits tractats amb palmitat (veure secció 4.3). No obstant això, es desconeixen els mecanismes a través dels quals l'AMPK efectua la inhibició de p38 i JNK.

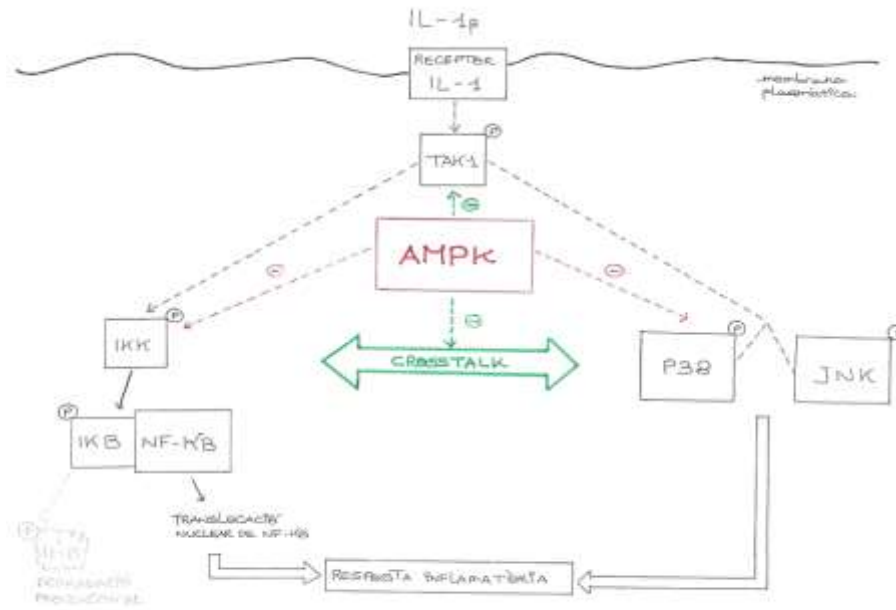


Figura 30. Modulació de la via del NF- κ B i de les MAPKs p38 i JNK per part de l'AMPK. En color verd s'indiquen els punts de regulació estudiats en aquest treball: la modulació de la TAK1 per part de l'AMPK i el possible crosstalk entre la via del NF- κ B i les MAPKs. Adaptat de Salt and Palmer, 2012.

L'objectiu d'aquest treball s'ha centrat en l'estudi dels mecanismes moleculars implicats en l'efecte de l'AMPK sobre la via del NF- κ B i les MAPKs p38 i JNK. En primer lloc s'estudiaren els efectes de l'AMPK sobre la cinasa 1 activada pel factor de creixement transformant β (TAK1). La TAK1 és una proteïna activada per citocines inflammatòries que es troba a un nivell *upstream* de p38, JNK i NF- κ B (Ninomiya-Tsuji et al., 1999), per la qual cosa no es pot descartar que l'AMPK exerceixi els seus efectes antiinflamatoris en aquest punt. Un segon hipotètic punt d'actuació alternatiu de l'AMPK sobre aquestes dues vies seria a nivell *downstream* a la TAK1 i contemplaria l'existència d'un *crosstalk* entre les MAPKs i la via del NF- κ B. Així, interessava determinar si l'activació de la via del NF- κ B estaria condicionada per l'activació prèvia de les MAPKs i, de la mateixa manera, si l'activació de p38 i JNK dependria de l'activació prèvia de la via del NF- κ B. En cas que existís aquest *crosstalk*, el següent objectiu seria analitzar si l'AMPK inhibeix conjuntament ambdues vies inflammatòries actuant sobre qualsevol d'elles.

Per dur a terme aquests experiments es varen emprar cèl·lules endotelials de vena de cordó umbilical humà (HUVECs) tractades amb IL-1 β per estimular les MAPKs i la via del NF- κ B, i amb el compost A769662 per activar a l'AMPK (Coughlan et al., 2014).

4.4.1. Resultats i discussió

S'ha proposat que la disfunció endotelial és un esdeveniment inicial en la fisiopatologia de la malaltia vascular i de la hipertensió i està associada a un estat inflamatori (Siti et al., 2015). Entre les citocines proinflamatòries cal destacar el TNF α , la IL-6 i la IL-1 β , les quals actuen sobre les cèl·lules endotelials i provoquen l'activació de vies inflamatòries, entre les que destaquen la del NF- κ B i les MAPKs, compromentent així la funció endotelial (O'Neill, 2008). Un punt a considerar és la importància de l'AMPK com a mecanisme antiinflamatori a les cèl·lules endotelials (Salt and Palmer, 2012). D'acord amb aquest rol antiinflamatori, en el present estudi es va constatar que l'activació de l'AMPK disminuïa la degradació d'I κ B induïda per la IL-1 β (fig. 31A) i, conseqüentment, la translocació nuclear del NF- κ B va ser menor (fig. 32). Entre els mecanismes proposats a través dels quals l'AMPK inhibeix la via del NF- κ B cal destacar la fosforilació i inhibició de l'IKK (Bess et al., 2011), de manera que és plausible considerar que en el nostre estudi l'AMPK va atenuar l'activació de la via del NF- κ B actuant sobre la IKK. D'altra banda, l'activació de l'AMPK va reduir també la fosforilació de p38 i de les isoformes p46 i p54 de JNK induïda per la IL-1 β (fig. 31C-E). Resultats similars s'han obtingut a cèl·lules endotelials tractades amb AICAR, un activador de l'AMPK, i amb H₂O₂ per estimular les vies inflamatòries (Schulz et al., 2008). A més, s'ha vist que la supressió de l'expressió de l'AMPK provoca una major activació endotelial de JNK (Dong et al., 2010). En conjunt, aquests resultats reforcen el rol antiinflamatori de l'AMPK a les cèl·lules endotelials.

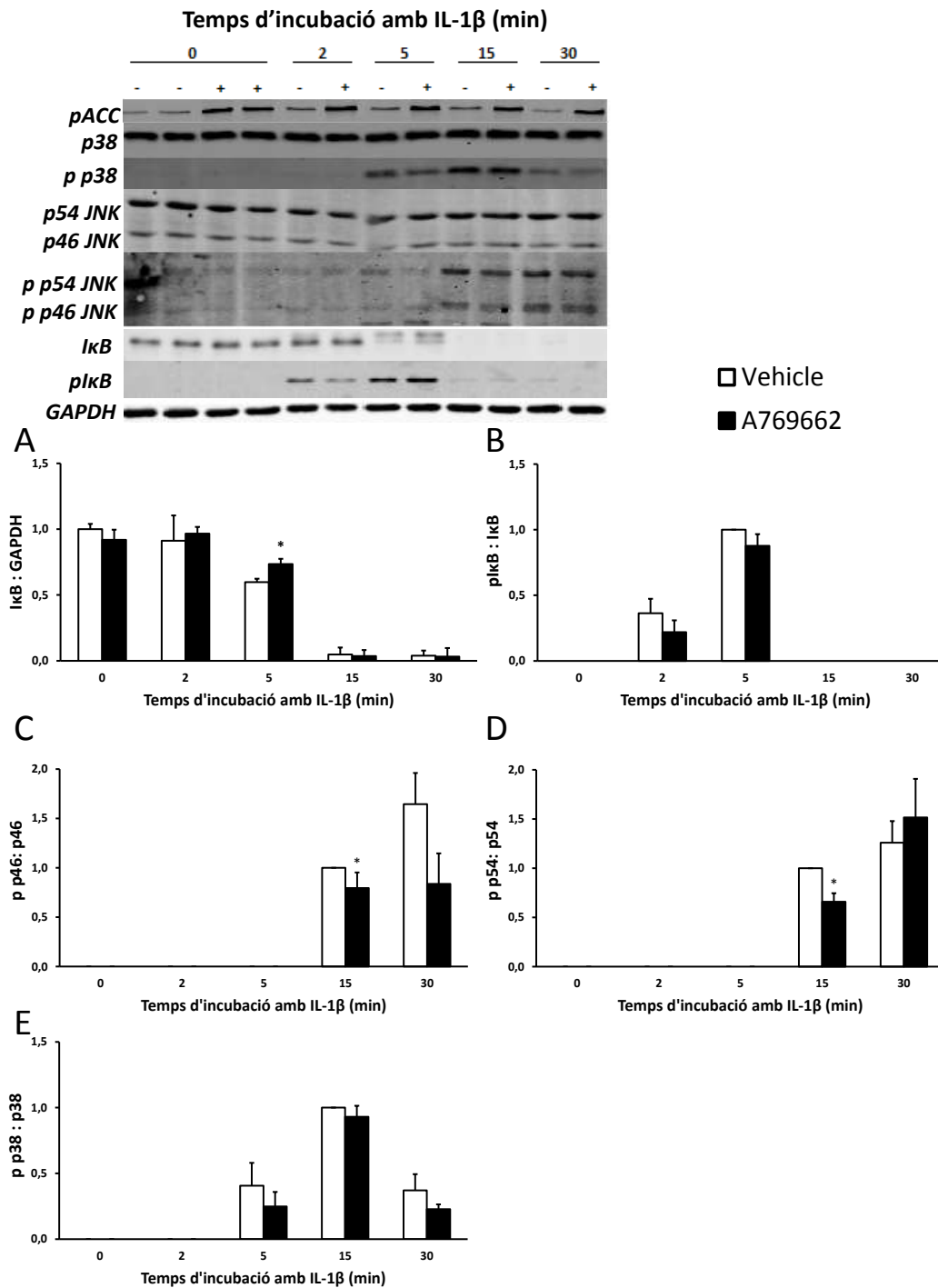


Figura 31. Efecte de l'activació de l'AMPK sobre la inhibició d'I κ B i l'activació de p38 i de JNK (p46/p54) a HUVECs estimulades amb IL-1 β durant diferent temps. ACC (280 kDa), acetil-CoA carboxilasa; I κ B (39 kDa), inhibidor del NF- κ B; JNK (46-54 kDa), cinasa de l'extrem N-terminal de c-Jun. Les HUVECs varen ser tractades amb A769662 100 μ M -activador de l'AMPK- durant 30 minuts i posteriorment amb IL-1 β 10 ng/ml durant 0, 2, 5, 15 i 30 minuts. Els valors s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de tres experiments independents (n=3). Les diferències estadísticament significatives varen ser determinades mitjançant un test t de Student: *, p<0.05.

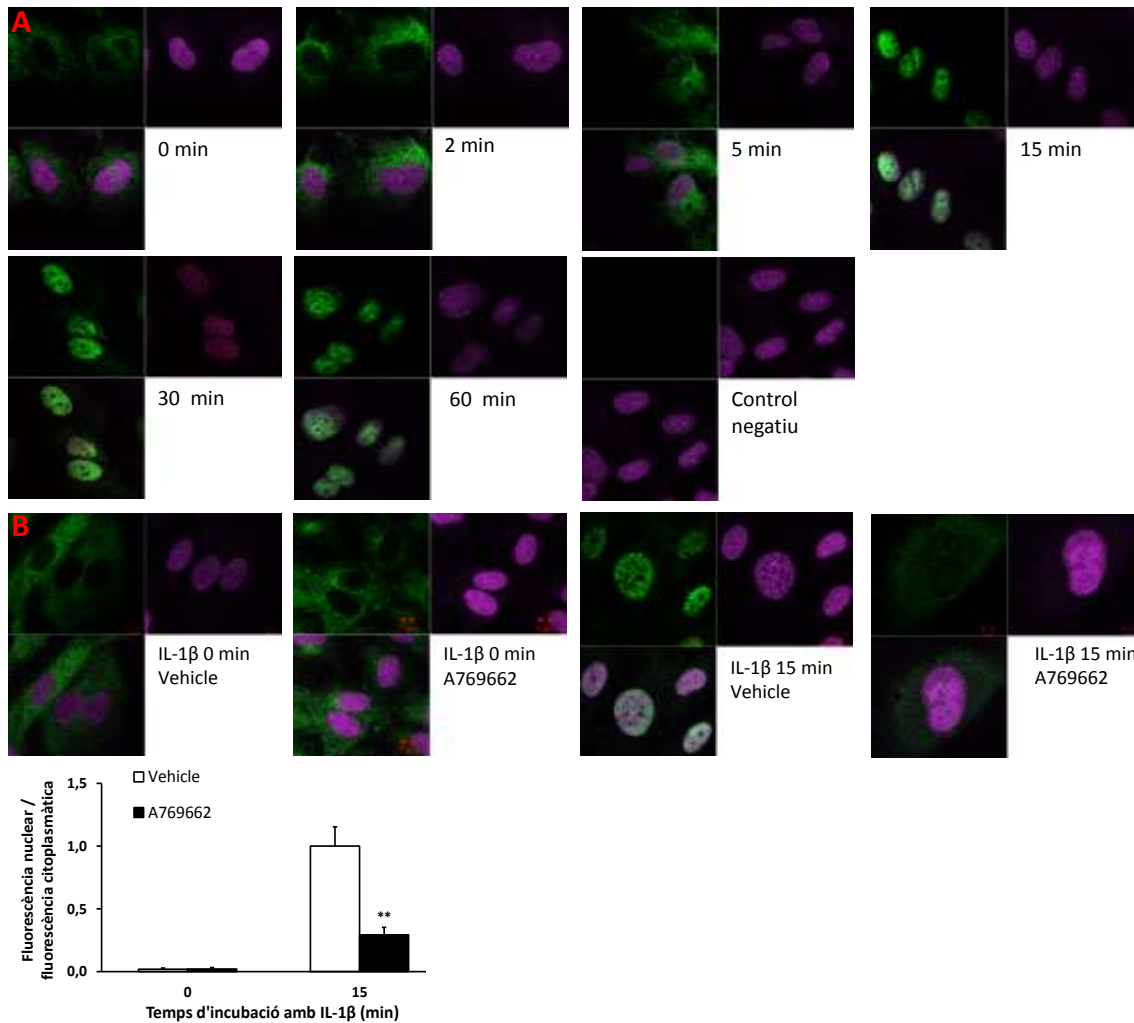


Figura 32. Translocació nuclear del NF- κ B a HUVECs. En verd s'observa la tinció del NF- κ B i en rosa la tinció nuclear. A) Les cèl·lules varen ser tractades amb IL-1 β 10 ng/ml durant 0, 2, 5, 15, 30 i 60 minuts. El control negatiu són mostres que no es varen incubar amb l'anticòs pel NF- κ B durant la tinció immunofluorescent. B) Les cèl·lules varen ser tractades durant 30 minuts amb A769662 100 μ M -activador de l'AMPK- i posteriorment amb IL-1 β 10 ng/ml durant 15 minuts. Els valors s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de dos experiments realitzats per duplicat (n=4). Les diferències estadísticament significatives varen ser determinades mitjançant un test t de Student: **, p<0.01.

Una vegada comprovats els efectes de l'AMPK sobre la via del NF- κ B i les MAPKs p38 i JNK, es va analitzar si l'atenuació d'aquestes vies podia ser deguda a un efecte inhibitori de l'AMPK sobre la TAK1, ja que aquesta proteïna es troba a un nivell *upstream* en relació a ambdues vies (Ninomiya-Tsuji et al., 1999). L'activació de l'AMPK va reduir la fosforilació dels residus de Thr de la TAK1 durant els cinc primers minuts d'incubació amb IL-1 β (fig. 37), encara que problemes metodològics impediren analitzar la fosforilació

dels residus concrets de Thr implicats en la senyalització d'aquesta citosina. Els nostres resultats suggereixen un efecte inhibitori de l'AMPK sobre l'activació de la TAK1, la qual cosa suposaria un mecanisme addicional en els efectes de l'AMPK sobre les vies del NF- κ B i de les MAPKs p38 i JNK. La fosforilació de la TAK1 en resposta a un estímul inflamatori requereix la participació de les proteïnes d'unió a TAK1 (TABs) (Orelia and Dzierzak, 2007), de manera que seria interessant analitzar si l'AMPK modula les TABs per profunditzar en els mecanismes d'inhibició de la TAK1. Paradoxalment, és important assenyalar que la TAK1 ha estat anteriorment descrita com una cinasa activadora de l'AMPK a cèl·lules endotelials (Zippel et al., 2013), per la qual cosa farien falta més estudis per elucidar completament la relació entre l'AMPK i la TAK1.

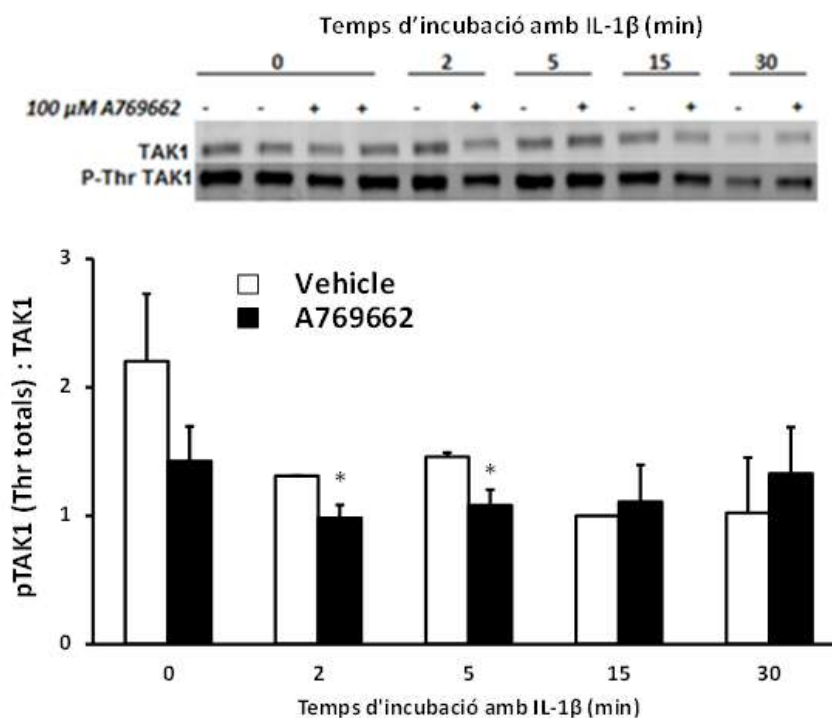


Figura 33. Efecte de l'activació de l'AMPK sobre l'activació de la TAK1 a HUVECs estimulades amb IL-1 β durant diferent temps. TAK1 (79 kDa), cinasa 1 activada pel factor de creixement transformant β . Les HUVECs varen ser tractades amb A769662 - activador de l'AMPK- 100 μ M durant 30 minuts i posteriorment amb 10 ng/ml de IL-1 β durant 0, 2, 5, 15 i 30 minuts. Els lisats cel·lulars varen ser immunoprecipitats amb un anticòs contra la forma total de la TAK1 (veure secció 3.4.13). Els valors s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de tres experiments (n=3). Les diferències estadísticament significatives varen ser determinades mitjançant un test t de Student: *, p < 0.05.

A més de la TAK1 com a punt comú d'inhibició de les MAPKs i del NF- κ B per part de l'AMPK, és possible que els efectes de l'AMPK sobre aquestes dues vies inflamatòries siguin interdependents a un nivell *downstream* respecte a la TAK1. És a dir, l'efecte de l'AMPK sobre la via del NF- κ B podria dependre de la inhibició prèvia de les MAPKs i/o viceversa. Si fos així, caldria pensar en l'existència d'un *crossstalk* entre els efectes de la IL-1 β sobre el NF- κ B i les MAPKs p38 i JNK, la qual cosa va ser analitzada en el present estudi. Es va observar que la inhibició de p38 no tenia efectes sobre la translocació nuclear del NF- κ B estimulada per la IL-1 β (fig. 34), i, de la mateixa manera, l'activació de p38 i JNK per part d'aquesta citocina no es veia afectada per la inhibició de la via del NF- κ B (fig. 35), la qual s'aconseguí mitjançant adenovirus que sobreexpressaven una forma negativa d'IKK (veure secció 3.3.2.). En conseqüència, sembla que no existeix aquest suposat *crossstalk* entre la via del NF- κ B i les MAPKs p38 i JNK en resposta a l'estimulació amb IL-1 β . Aquests resultats estan d'acord amb estudis previs realitzats en fibroblasts MEFs, on l'activació de JNK per part de la IL-1 és igual a les cèl·lules IKK^{-/-} que a les salvatges (Tang et al., 2001). En canvi, en aquest mateix treball va veure's com l'activació de la JNK per part del TNF α és major als fibroblasts IKK^{-/-}. Per tant, no es pot descartar que a les cèl·lules endotelials la via del NF- κ B pugui afectar a l'activació de JNK quan l'estímul inflamatori sigui diferent a la IL-1 β . La falta d'interrelació entre ambdues vies inflamatòries indicada pels nostres resultats ens duu a pensar que els efectes de l'AMPK sobre la via del NF- κ B i sobre p38 i JNK a les HUVECs són independents entre si. No obstant això, si podria haver-hi una relació entre ambdues vies a un nivell *downstream* respecte al que s'ha estudiat. Per exemple, s'ha vist que p38 incrementa la capacitat del NF- κ B ja translocat al nucli d'unir-se al promotor dels gens diana i activar la resposta inflamatòria (Saccani et al., 2002). Seguint aquesta línia, s'haurien de dur a terme futurs experiments per analitzar els efectes de l'AMPK sobre la síntesi de citocines i quimiocines estimulada per les vies del NF- κ B i les MAPKs.

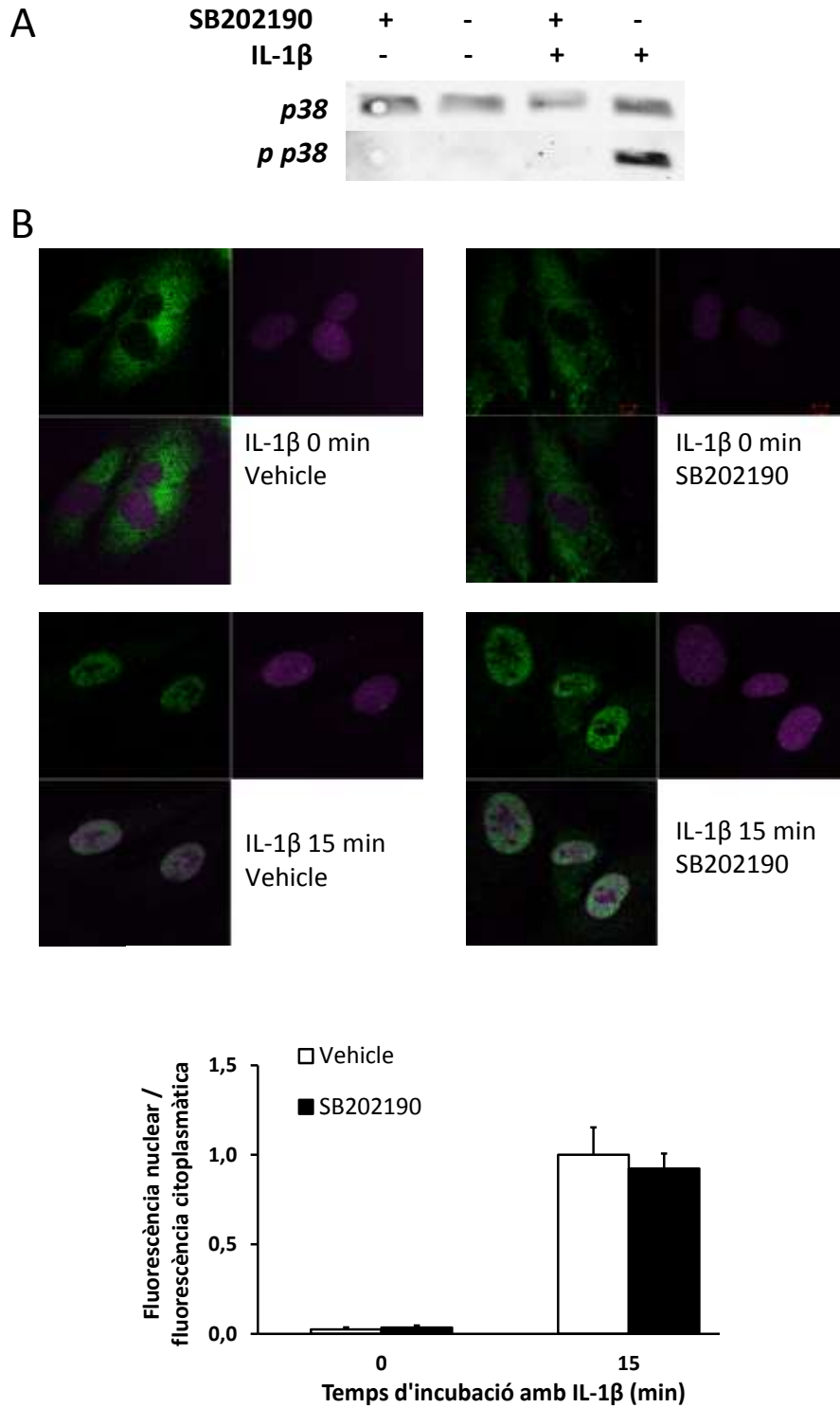


Figura 34. Efecte de la inhibició de p38 sobre la translocació nuclear del NF- κ B estimulada per la IL-1 β a HUVECs. Les cèl·lules varen ser tractades durant 30 minuts amb SB202190 100 μ M -inhibidor de p38- i posteriorment amb IL-1 β 10 ng/ml durant 15 minuts. A) Western blot dels nivells de la forma total i fosforilada de p38. B) Translocació nuclear del NF- κ B. Els valors s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de dos experiments realitzats per duplicat (n=4). Les diferències estadísticament significatives entre tractaments varen ser determinades mitjançant un test t de Student.

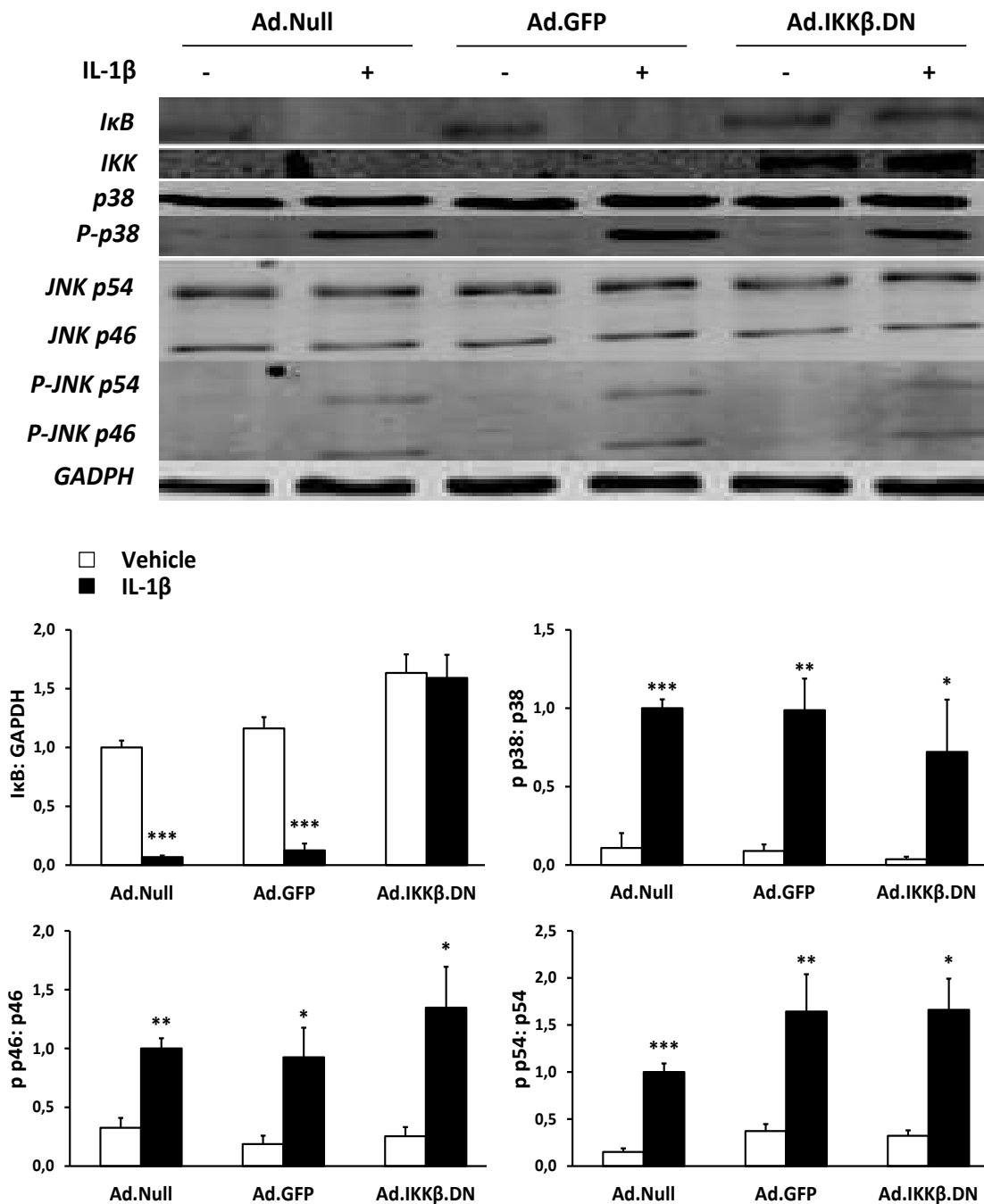


Figura 35. Efecte de la inhibició d'IKK sobre l'activació de p38 i JNK estimulada per la IL-1 β a HUVECs. GFP, proteïna verda fluorescent; I κ B (39 kDa), inhibidor del NF- κ B; IKK (85 kDa), cinasa de I κ B; JNK (46-54 kDa), cinasa de l'extrem N-terminal de c-Jun. (A) Les cèl·lules varen ser transfectades amb 60 ufp/ml d'adenovirus que sobreexpressaven una forma dominant negativa de la subunitat β d'IKK (Ad.IKK β .DN) o la GFP (Ad.GFP) durant 24h i posteriorment es varen tractar amb IL-1 β durant 15 minuts. Els valors s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de tres experiments (n=3). Les diferències estadísticament significatives varen ser determinades mitjançant un test t de Student: *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001.

Els efectes antiinflamatoris de l'AMPK sobre aquestes vies podrien implicar també una atenuació dels ROS, ja que aquestes espècies reactives provoquen l'activació de la via del NF- κ B (Morgan and Liu, 2011; Zinovkin et al., 2014), de p38 (Bretón-Romero et al., 2012) i de JNK (Lin et al., 2004) a cèl·lules endotelials. Així doncs, s'ha vist que l'AMPK disminueix l'activació provocada pels ROS de la via del NF- κ B (Hattori et al., 2006) i de JNK (Schulz et al., 2008) a cèl·lules endotelials. Per tant, els efectes antioxidants de l'AMPK suposarien un mecanisme addicional que podria intervenir en l'acció antiinflamatòria d'aquesta cinasa sobre la via del NF- κ B i les MAPKs.

En resum, aquest estudi mostra com els efectes antiinflamatoris de l'AMPK sobre la via del NF- κ B i les MAPKs p38 i JNK a cèl·lules endotelials podrien deure's, almenys en part, a l'atenuació de la TAK1, una proteïna *upstream* d'ambdues vies. Els resultats obtinguts suggereixen que no hi ha un *crosstalk* entre els efectes de la IL-1 β activant les MAPKs i la via del NF- κ B, per la qual cosa els efectes de l'AMPK inhibint una d'aquestes vies no requeririen la inhibició prèvia de l'altra via. En conjunt, aquests resultats reforcen el rol antiinflamatori de l'AMPK a les cèl·lules endotelials i la seva importància com a diana terapèutica per a tractar els processos inflamatoris que acompanyen a les malalties vasculars.

5. RECAPITULACIÓ

Recapitulació

Estudis previs realitzats pel nostre grup d'investigació havien posat de manifest que el múscul cardíac de les rates femella presenta mitocondris més diferenciats que el dels mascles, la qual cosa s'acompanya d'una menor producció de radicals lliures i un menor dany oxidatiu (Colom et al., 2007b). A partir d'aquests antecedents, es va plantejar com objectiu general de la present tesi doctoral aprofundir en les causes d'aquest dimorfisme sexual, fent èmfasi en el paper dels estrògens en la regulació de la funció i la biogènesi mitocondrials al múscul cardíac, així com en els efectes d'aquestes hormones en la lipotoxicitat cardíaca. Per a dur-ho a terme s'han combinat estudis *in vivo* amb rates Wistar i estudis *in vitro* amb cardiomiòcits H9c2.

L'estudi del cor de les rates ovariectomitzades demostra que la privació d'hormones ovàriques disminueix la capacitat oxidativa mitocondrial i augmenta l'estrès oxidatiu al miocardi, efectes que són contrarestats, en gran part, amb l'administració d'E₂. Aquests resultats *in vivo* varen ser completats i recolzats amb un estudi dut a terme amb cardiomiòcits H9c2, on s'observa també un increment en l'expressió de marcadors de funció i de biogènesi mitocondrials en resposta al tractament amb E₂. Per tant, es confirma la hipòtesi de que els estrògens contribueixen activament al dimorfisme sexual en la funció i la biogènesi mitocondrials i en l'estrès oxidatiu cardíacs prèviament descrits (Colom et al., 2007b). Tenint en compte la importància del metabolisme mitocondrial en el correcte funcionament cardíac, el major risc de patologia cardíaca a les dones després de la menopausa podria explicar-se en base a les conseqüències de la disminució de la producció d'estrògens sobre la funció i la biogènesi mitocondrial i l'estrès oxidatiu cardíacs (Ostadal et al., 2009; Mikkola et al., 2013). En aquest sentit, s'ha observat una afectació de la funció mitocondrial i l'estrès oxidatiu cardíacs associada a l'envelliment que és més accentuada a les rates femella (Colom et al., 2014), d'acord amb la disminució progressiva dels nivells d'estrògens.

L'estudi dels mecanismes a través dels quals l'E₂ modula el metabolisme energètic mitocondrial va posar de manifest que l'administració d'aquesta hormona a les rates ovariectomitzades incrementa els nivells del receptor d'estrògens GPER, però no altera els d'ER α ni els d'ER β , la qual cosa apunta a que la implicació de cada un d'aquests receptors estrogènics en els efectes mitocondrials de l'E₂ podria ser diferent. Aquest fet es demostra als cardiomiòcits H9c2, on l'estimulació del GPER mimetitzava els efectes de l'E₂ i la seva inhibició els neutralitza, mentre que la modulació d'ER α i d'ER β no produeix cap efecte. Per tant, els efectes de l'E₂ estimulants la funció i la biogènesi mitocondrials al múscul cardíac estarien mediatos per mecanismes que impliquen principalment al GPER. Fins ara se sabia que aquesta proteïna, entre altres efectes, millora la contractilitat cardíaca i disminueix l'apoptosi i la hipertròfia d'aquest òrgan (Prossnitz and Barton, 2014), però no s'havia descrit que estimulés el metabolisme energètic, per la qual cosa el present estudi incrementa el nombre de funcions cardioprotectores del GPER.

L'alteració de la funció i la biogènesi mitocondrials és un esdeveniment implicat en el desenvolupament de varis tipus de desordres metabòlics al cor, entre els quals cal destacar la lipotoxicitat. Així, quan augmenten els lípids circulants, el miocardi modifica el seu metabolisme incrementant la captació i l'oxidació d'àcids grassos i la biogènesi mitocondrial, i provocant una reducció de l'ús de glucosa, una major formació de ROS i un increment de l'esteatosi (Schilling, 2015). L'alimentació amb una HFD suposa una eina efectiva per incrementar la lipèmia i, consegüentment, per induir un perfil metabòlic lipotòxic al cor, de manera que, seguint amb el nostre plantejament inicial, es tracta d'un model idoni per analitzar si existeixen diferències entre sexes en el desenvolupament de la lipotoxicitat cardíaca. Encara que els resultats obtinguts mostren un increment dels nivells de marcadors del metabolisme lipídic cardíac a ambdós sexes, suggereixen una estratègia metabòlica diferent entre mascles i femelles, amb una menor esteatosi, un major ús de glucosa

com a substrat i un menor dany oxidatiu al miocardi de les rates femella en comparació amb el dels mascles. Les femelles mostren, doncs, una major resistència a desenvolupar la disfunció metabòlica que caracteritza el procés lipotòxic cardíac. D'altra banda, l'alimentació amb la HFD induïx una estimulació de la biogènesi mitocondrial als dos sexes, cosa que en principi podríem interpretar com un mecanisme encaminat a fer front a l'increment de l'oxidació lipídica generat per l'elevat subministrament de substrats lipídics al cor. Tot i aquest increment de la biogènesi mitocondrial, mantenir aquest perfil metabòlic conduiria a una major formació de ROS i d'espècies lipídiques tòxiques que poden provocar disfunció mitocondrial (Schilling, 2015). Malgrat la manca de dimorfisme sexual en resposta a l'alimentació amb la HFD a nivell de metabolisme mitocondrial, quan es sotmeten els cardiomiòcits H9c2 a un entorn lipotòxic més sever s'observa que l'E₂ redueix la disfunció mitocondrial i l'estrès oxidatiu originats per la lipotoxicitat. Per tant, seria interessant la realització de futurs estudis per analitzar el dimorfisme sexual en la funció i la biogènesi mitocondrials en una situació de lipotoxicitat cardíaca més severa. Atenent a aquests resultats, l'estimulació de la funció i la biogènesi mitocondrials i l'atenuació de l'estrès oxidatiu al miocardi per part de l'E₂ que també s'havia observat a les rates ovariectomitzades podria ser especialment rellevant en desordres metabòlics que comprometin l'homeòstasi dels mitocondris, com és la lipotoxicitat cardíaca.

L'AMPK és un sensor metabòlic que activa vies catabòliques, com ara la biogènesi mitocondrial i la captació i l'oxidació de lípids i glúcids (Lopaschuk et al., 2010), i redueix l'estrès oxidatiu (Barreto-Torres et al., 2015), per la qual cosa pot exercir un paper clau en els efectes dels estrògens fins ara descrits. En aquesta línia, cal destacar la major activació de l'AMPK cardíaca a les femelles alimentades amb la HFD respecte als mascles, fet que podria explicar la major resistència cardíaca als efectes lipotòxics de la HFD que aquestes presenten. Entre els factors implicats en aquesta major activació de l'AMPK

cal destacar l'adiponectina i l'E₂. L'adiponectina és una adipoquina que exerceix efectes pleiotròpics sobre el sistema cardiovascular principalment a través de l'activació de l'AMPK (Caselli et al., 2014). En resposta al tractament dietètic, les femelles presenten nivells circulants d'adiponectina majors que els mascles i són més resistents als efectes de la HFD atenuant de la via de senyalització d'aquesta adipoquina al cor, fets que contribuirien a la seva major activació de l'AMPK. A més de l'adiponectina, els estudis *in vitro* demostren que l'E₂ indueix l'activació de l'AMPK a cardiomiòcits i manté aquest efecte en condicions de lipotoxicitat, de manera que suposaria un segon factor a tenir en compte per explicar el dimorfisme sexual en l'activació de l'AMPK cardíaca. Cal destacar també que l'E₂ neutralitza en gran part els efectes negatius de la lipotoxicitat sobre la via de senyalització de l'adiponectina a cardiomiòcits, per la qual cosa incrementaria la sensibilitat a aquesta adipoquina i, per tant, l'activació de l'AMPK. Així doncs, uns majors nivells d'adiponectina i una menor afectació dels elements de seva via de senyalització degut a l'E₂, així com un efecte directe de l'E₂ serien elements que contribuirien a la major activació de l'AMPK al miocardi de les rates femella alimentades amb la HFD i, conseqüentment, a la major resistència al desenvolupament de lipotoxicitat cardíaca d'aquest sexe.

En una fase avançada de la lipotoxicitat cardíaca s'activen vies inflamatòries, com les MAPKs, que agreugen el fenotip lipotòxic i poden conduir a una fallida cardíaca (Palomer et al., 2013; Schilling, 2015). En aquesta tesi doctoral es va posar de manifest un efecte antiinflamatori de l'E₂ sobre les vies inflamatòries de les MAPKs a cardiomiòcits sotmesos a un entorn lipotòxic. No obstant, encara que l'AMPK constitueix un important element antiinflamatori d'aquestes cèl·lules (Haffar et al., 2015), els efectes de l'E₂ es mantenen quan s'inhibeix l'AMPK, demostrant que aquesta cinasa no tindria una participació rellevant en els efectes antiinflamatoris dels estrògens sobre les vies de les MAPKs a cardiomiòcits en condicions de lipotoxicitat. Per tant,

els estrògens i l'AMPK inhibirien a les MAPKs per mecanismes diferents, encara que no es pot descartar que activin o inhibeixin a algun element *upstream* en comú, com seria el cas del TLR4 i la PI3K, així com tampoc que la connexió E₂-AMPK pugui ser important per l'atenuació d'altres vies inflammatòries implicades en el procés lipotòxic, com ara la del NF- κ B.

Una de les principals causes de l'increment de la lipèmia i, per tant, del desenvolupament de la lipotoxicitat cardíaca, és la disfunció del teixit adipós. Quan la ingesta de lípids és elevada se satura la capacitat d'emmagatzemament lipídic d'aquest teixit, de manera que els lípids són captats per òrgans perifèrics que no estan destinats a aquesta funció, com és el cas del cor, originant-se esteatosi i lipotoxicitat (McKenney and Short, 2011). A més, la disfunció del teixit adipós va associada a una menor secreció d'adiponectina, una adipoquina amb efectes cardioprotectors (Van de Voorde et al., 2013). Així doncs, el teixit adipós suposa una de les principals dianes terapèutiques per tractar la lipotoxicitat cardíaca. En aquest sentit cal destacar les TZDs, un grup de fàrmacs que incrementen la capacitat d'emmagatzemar lípids i de secretar adiponectina al teixit adipós (Ahmadian et al., 2013). Per aquest motiu el nostre estudi va incloure animals tractats amb un d'aquests fàrmacs, la Rsg, la qual indueix canvis en el perfil metabòlic del cor lipotòxic que són considerablement més notoris a les femelles en forma d'una menor captació d'àcids grassos i un increment de l'oxidació lipídica, de l'ús de glucosa, de la biogènesi i la funció mitocondrials i de les defenses antioxidants. Per tant, les rates femella, a més de presentar una major resistència que els mascles al desenvolupament de la lipotoxicitat cardíaca originada per l'alimentació amb una HFD, també són més sensibles als efectes beneficiosos de la Rsg sobre el metabolisme del cor lipotòxic.

La disminució de la lipotoxicitat que s'observa als dos sexes en resposta a la Rsg podria radicar en l'augment de l'activació de l'AMPK cardíaca, la qual cosa és probablement conseqüència dels majors nivells d'adiponectina

originats per la Rsg. Les femelles, però, mantenen uns nivells d'activació de l'AMPK superiors als dels mascles, fet que podria contribuir a la seva major sensibilitat a la Rsg. En aquest cas, l'E₂ sembla ser el principal factor implicat en aquest dimorfisme ja que conserva la capacitat d'activar l'AMPK en presència d'adiponectina. Per tant, els nostres resultats apunten a un efecte sinèrgic de l'adiponectina i l'E₂ sobre l'activació de l'AMPK al múscul cardíac de les rates femella, explicant-se així aquesta major resposta farmacològica de les femelles.

En conjunt, aquests resultats indiquen que la millor resposta del cor de les femelles als efectes lipotòxics de la HFD podria deure's a un efecte de l'E₂ estimulants la biogènesi mitocondrial, activant l'AMPK, i reduint l'estrès oxidatiu i l'activació de vies inflammatòries. A més, aquests efectes de l'E₂ es mantindrien en presència de Rsg, de manera que la suma de l'acció hormonal i la farmacològica podria contribuir a la major reducció de la lipotoxicitat cardíaca a les femelles. El dimorfisme sexual en els efectes farmacològics de la Rsg és una de les contribucions d'aquesta tesi doctoral i podria ser important en el disseny d'estratègies terapèutiques per disminuir els efectes secundaris de les TZDs.

Considerant la importància de l'AMPK com a potencial diana terapèutica per a processos metabòlics i inflamatoris, el doctorant va realitzar una estada de tres mesos al grup del Dr. Salt del *Institute of Cardiovascular and Medical Sciences* de la Universitat de Glasgow. Durant aquest període va indagar en els mecanismes moleculars a través dels quals l'AMPK disminueix l'activació, induïda per la IL-1 β , de les vies del NF- κ B i de les MAPKs p38 i JNK a cèl·lules endotelials. Els resultats obtinguts suggereixen que l'AMPK disminueix l'activació de la TAK1, una proteïna *upstream* d'aquestes dues vies inflammatòries, la qual cosa suposaria un nou mecanisme antiinflamatori de l'AMPK. Quedaria pendent dilucidar el possible paper de l'AMPK en els

efectes antiinflamatoris de l'E₂ que s'han observat a cèl·lules endotelials (Hou and Pei, 2015).

En conjunt, els resultats obtinguts en aquesta tesi doctoral estableixen que els estrògens són importants moduladors de la funció i la biogènesi mitocondrials i de l'estrès oxidatiu al múscul cardíac. Aquests efectes serien particularment importants en situacions patològiques que comprometin l'homeòstasi dels mitocondris, com és el cas de la lipotoxicitat cardíaca, i suposarien un factor important a tenir en compte en el disseny de fàrmacs moduladors del metabolisme cardíac.

6. CONCLUSIONS

Conclusions

- I. L'estradiol estimula la funció i la biogènesi mitocondrials i redueix el dany oxidatiu al múscul cardíac de rata, la qual cosa suggereix que aquesta hormona tindria un paper rellevant en el dimorfisme sexual descrit a nivell de la diferenciació mitocondrial i l'estrès oxidatiu cardíacs. Aquests resultats podrien contribuir a explicar l'increment del risc de patologia cardíaca en la peri- i la post-menopausa.
- II. Estudis realitzats a cardiomiòcits H9c2 posen de manifest que els efectes de l'estradiol estimulants la funció i la biogènesi mitocondrials es duen a terme, fonamentalment, a través de la seva unió al GPER, la qual cosa suposa un nou mecanisme cardioprotector per aquest receptor estrogènic.
- III. Les rates femella són més resistents que els mascles al desenvolupament d'una lipotoxicitat cardíaca induïda per l'alimentació amb una dieta hiperlipídica ja que presenten menor esteatosi i menor dany oxidatiu al miocardi. Els efectes de l'estradiol estimulants la funció i la biogènesi mitocondrials i atenuant l'estrès oxidatiu es donen també en situació d'estrès lipotòxic, de manera que aquesta hormona estaria implicada en la major protecció de les femelles als efectes lipotòxics d'una dieta hiperlipídica.
- IV. L'administració de rosiglitazona atenua la lipotoxicitat cardíaca, disminuint la captació i l'acumulació de lípids, incrementant l'oxidació lipídica i la biogènesi mitocondrial, i reduint l'estrès oxidatiu en aquest òrgan, efectes que són més marcats a les rates femella.
- V. La major activació de l'AMPK cardíaca a les rates femella en comparació amb els mascles es atribuïble als majors nivells d'estradiol i d'adiponectina, i justificaria les diferències entre sexes en la resposta

lipotòxica a l'alimentació amb la dieta hiperlipídica i als beneficis del tractament amb rosiglitazona.

- VI.** L'estradiol i l'AMPK atenuen l'activació de les vies inflammatòries de les MAPKs a cardiomiòcits H9c2 en una situació lipotòxica, però aquests efectes antiinflamatoris de l'estradiol no impliquen a l'AMPK, malgrat els seus efectes activadors sobre aquesta cinasa.

- VII.** A cèl·lules endotelials s'ha descrit un nou mecanisme antiinflamatori de l'AMPK que implicaria una disminució de l'activació de la TAK1, una proteïna que activa simultàniament les vies del NF- κ B i de les MAPKs p38 i JNK.

Conclusions

- I. Estradiol stimulates mitochondrial biogenesis and function and reduces oxidative damage in rat cardiac muscle, suggesting a relevant role of this hormone in the sexual dimorphism that has been described in cardiac mitochondrial differentiation and oxidative stress. These results contribute to explain the increase in risk of cardiac disease in peri and post-menopause.
- II. Studies performed in H9c2 cardiomyocytes reveal that the stimulating effects of estradiol on mitochondrial function and biogenesis are produced mainly through binding to GPER, which represents a new cardioprotector mechanism for this estrogen receptor.
- III. Female rats are more resistant than males to the development of cardiac lipotoxicity induced by high-fat diet feeding as they have lower steatosis and oxidative damage in the heart. The effects of estradiol in enhancing mitochondrial function and biogenesis and mitigating oxidative stress also occur during lipotoxic stress, thus this hormone could contribute to the greater resistance of female rats to the lipotoxic effects of a high-fat diet.
- IV. The administration of rosiglitazone attenuates cardiac lipotoxicity by decreasing lipid uptake and accumulation, increasing lipid oxidation and mitochondrial biogenesis, and reducing oxidative stress in this organ, effects that are more pronounced in female rats.
- V. The greater activation of cardiac AMPK in female rats compared to males could be attributed to higher levels of estradiol and adiponectin, and would explain the sex differences in the lipotoxic effects of high-fat diet feeding and in the benefits of rosiglitazone treatment.

- VI.** Both estradiol and AMPK diminish the activation of MAPK inflammatory pathways in H9c2 cardiomyocytes in a lipotoxic situation, but the anti-inflammatory effects of estradiol do not involve AMPK, in spite of the effects of this hormone in activating this kinase.

- VII.** In endothelial cells a new anti-inflammatory mechanism of AMPK is described, which would involve an attenuation of TAK1 activation, a protein that activates NF- κ B and JNK/p38 pathways simultaneously.

7. REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

- Ahmadian, M., Suh, J.M., Hah, N., Liddle, C., Atkins, A.R., Downes, M., et al. (2013). PPAR γ signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nat. Med.* *19*: 557–66.
- Alaynick, W.A., Kondo, R.P., Xie, W., He, W., Dufour, C.R., Downes, M., et al. (2007). ERR γ directs and maintains the transition to oxidative metabolism in the postnatal heart. *Cell Metab.* *6*: 13–24.
- Amengual-Cladera, E., Lladó, I., Gianotti, M., and Proenza, A.M. (2012). Sex differences in the effect of high-fat diet feeding on rat white adipose tissue mitochondrial function and insulin sensitivity. *Metabolism.* *61*: 1108–17.
- An, D., Kewalramani, G., Chan, J.K.Y., Qi, D., Ghosh, S., Pulinilkunnil, T., et al. (2006). Metformin influences cardiomyocyte cell death by pathways that are dependent and independent of caspase-3. *Diabetologia* *49*: 2174–2184.
- Aon, M.A., Tocchetti, C.G., Bhatt, N., Paolocci, N., and Cortassa, S. (2015). Protective mechanisms of mitochondria and heart function in diabetes. *Antioxid. Redox Signal.* *22*: 1563–86.
- Arad, M., Seidman, C.E., and Seidman, J.G. (2007). AMP-activated protein kinase in the heart: role during health and disease. *Circ. Res.* *100*: 474–88.
- Arany, Z., He, H., Lin, J., Hoyer, K., Handschin, C., Toka, O., et al. (2005). Transcriptional coactivator PGC-1 α controls the energy state and contractile function of cardiac muscle. *Cell Metab.* *1*: 259–71.
- Arias-Loza, P.-A., Kreissl, M.C., Kneitz, S., Kaiser, F.R., Israel, I., Hu, K., et al. (2012). The estrogen receptor- α is required and sufficient to maintain physiological glucose uptake in the mouse heart. *Hypertension* *60*: 1070–7.
- Ashrafian, H., Docherty, L., Leo, V., Towlson, C., Neilan, M., Steeples, V., et al. (2010). A mutation in the mitochondrial fission gene *Dnm1l* leads to cardiomyopathy. *PLoS Genet.* *6*: e1001000.
- Baltgalvis, K.A., Greising, S.M., Warren, G.L., and Lowe, D.A. (2010). Estrogen regulates estrogen receptors and antioxidant gene expression in mouse skeletal muscle. *PLoS One* *5*: e10164.
- Bar-Or, D., Bar-Or, R., Rael, L.T., and Brody, E.N. (2015). Oxidative stress in severe acute illness. *Redox Biol.* *4C*: 340–345.
- Barreto-Torres, G., Hernandez, J.S., Jang, S., Rodríguez-Muñoz, A.R., Torres-Ramos, C.A., Basnakian, A.G., et al. (2015). The beneficial effects of AMP kinase activation against oxidative stress are associated with prevention of PPAR α -cyclophilin D interaction in cardiomyocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *308*: H749–58.

Basciano, H., Federico, L., and Adeli, K. (2005). Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia. *Nutr. Metab. (Lond)*. 2: 5.

Bastien, M., Poirier, P., Lemieux, I., and Després, J.-P. (2014). Overview of epidemiology and contribution of obesity to cardiovascular disease. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 56: 369–81.

Bayeva, M., Sawicki, K.T., and Ardehali, H. (2013). Taking diabetes to heart--deregulation of myocardial lipid metabolism in diabetic cardiomyopathy. *J. Am. Heart Assoc.* 2: e000433.

Berthois, Y., Katzenellenbogen, J.A., and Katzenellenbogen, B.S. (1986). Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83: 2496–500.

Bess, E., Fisslthaler, B., Frömel, T., and Fleming, I. (2011). Nitric oxide-induced activation of the AMP-activated protein kinase $\alpha 2$ subunit attenuates I κ B kinase activity and inflammatory responses in endothelial cells. *PLoS One* 6: e20848.

Björnström, L., and Sjöberg, M. (2005). Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol. Endocrinol.* 19: 833–42.

Bogenhagen, D., and Clayton, D.A. (1977). Mouse L cell mitochondrial DNA molecules are selected randomly for replication throughout the cell cycle. *Cell* 11: 719–27.

Bolisetty, S., and Jaimes, E.A. (2013). Mitochondria and reactive oxygen species: physiology and pathophysiology. *Int. J. Mol. Sci.* 14: 6306–44.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248–54.

Branco, A.F., Pereira, S.P., Gonzalez, S., Gusev, O., Rizvanov, A.A., and Oliveira, P.J. (2015). Gene Expression Profiling of H9c2 Myoblast Differentiation towards a Cardiac-Like Phenotype. *PLoS One* 10: e0129303.

Bray, G.A. (2004). Medical consequences of obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89: 2583–9.

Bretón-Romero, R., González de Orduña, C., Romero, N., Sánchez-Gómez, F.J., Álvaro, C. de, Porras, A., et al. (2012). Critical role of hydrogen peroxide signaling in the sequential activation of p38 MAPK and eNOS in laminar shear stress. *Free Radic. Biol. Med.* 52: 1093–100.

Brochu-Gaudreau, K., Rehfeldt, C., Blouin, R., Bordinon, V., Murphy, B.D., and Palin, M.-F. (2010). Adiponectin action from head to toe. *Endocrine* 37: 11–32.

Brown, L.M., and Clegg, D.J. (2010). Central effects of estradiol in the regulation of food intake, body weight, and adiposity. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 122: 65–73.

Burelle, Y., and Hochachka, P.W. (2002). Endurance training induces muscle-specific changes in mitochondrial function in skinned muscle fibers. *J. Appl. Physiol.* 92: 2429–38.

Burkart, E.M., Sambandam, N., Han, X., Gross, R.W., Courtois, M., Gierasch, C.M., et al. (2007). Nuclear receptors PPARbeta/delta and PPARalpha direct distinct metabolic regulatory programs in the mouse heart. *J. Clin. Invest.* 117: 3930–9.

Busiello, R.A., Savarese, S., and Lombardi, A. (2015). Mitochondrial uncoupling proteins and energy metabolism. *Front. Physiol.* 6: 36.

Campbell, C.T., Kolesar, J.E., and Kaufman, B.A. (2012). Mitochondrial transcription factor A regulates mitochondrial transcription initiation, DNA packaging, and genome copy number. *Biochim. Biophys. Acta* 1819: 921–9.

Capllonch-Amer, G., Lladó, I., Proenza, A.M., García-Palmer, F.J., and Gianotti, M. (2014a). Opposite effects of 17- β estradiol and testosterone on mitochondrial biogenesis and adiponectin synthesis in white adipocytes. *J. Mol. Endocrinol.* 52: 203–14.

Capllonch-Amer, G., Sbert-Roig, M., Galmés-Pascual, B.M., Proenza, A.M., Lladó, I., Gianotti, M., et al. (2014b). Estradiol stimulates mitochondrial biogenesis and adiponectin expression in skeletal muscle. *J. Endocrinol.* 221: 391–403.

Caselli, C., D'Amico, A., Cabiati, M., Prescimone, T., Ry, S. Del, and Giannessi, D. (2014). Back to the heart: The protective role of adiponectin. *Pharmacol. Res.* 82: 9–20.

Chaput, E., Saladin, R., Silvestre, M., and Edgar, A.D. (2000). Fenofibrate and rosiglitazone lower serum triglycerides with opposing effects on body weight. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 271: 445–50.

Chen, J.-Q., Cammarata, P.R., Baines, C.P., and Yager, J.D. (2009a). Regulation of mitochondrial respiratory chain biogenesis by estrogens/estrogen receptors and physiological, pathological and pharmacological implications. *Biochim. Biophys. Acta* 1793: 1540–70.

Chen, L., Gong, Q., Stice, J.P., and Knowlton, A.A. (2009b). Mitochondrial OPA1, apoptosis, and heart failure. *Cardiovasc. Res.* 84: 91–9.

Chrzanowska-Lightowlers, Z.M., Turnbull, D.M., and Lightowlers, R.N. (1993). A microtiter plate assay for cytochrome c oxidase in permeabilized whole cells. *Anal. Biochem.* 214: 45–9.

Colom, B., Alcolea, M., Valle, A., Oliver, J., Roca, P., and García-Palmer, F. (2007a). Skeletal Muscle of Female Rats Exhibit Higher Mitochondrial Mass and Oxidative-Phosphorylative Capacities Compared to Males. *Cell. Physiol. Biochem.* *19*: 205–212.

Colom, B., Oliver, J., and Garcia-Palmer, F.J. (2014). Sexual Dimorphism in the Alterations of Cardiac Muscle Mitochondrial Bioenergetics Associated to the Ageing Process. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.*

Colom, B., Oliver, J., Roca, P., and Garcia-Palmer, F.J. (2007b). Caloric restriction and gender modulate cardiac muscle mitochondrial H₂O₂ production and oxidative damage. *Cardiovasc. Res.* *74*: 456–65.

Coort, S.L.M., Bonen, A., Vusse, G.J. van der, Glatz, J.F.C., and Luiken, J.J.F.P. (2007). Cardiac substrate uptake and metabolism in obesity and type-2 diabetes: role of sarcolemmal substrate transporters. *Mol. Cell. Biochem.* *299*: 5–18.

Coughlan, K.A., Valentine, R.J., Ruderman, N.B., and Saha, A.K. (2014). AMPK activation: a therapeutic target for type 2 diabetes? *Diabetes. Metab. Syndr. Obes.* *7*: 241–53.

Cox, A.G., Winterbourn, C.C., and Hampton, M.B. (2010). Mitochondrial peroxiredoxin involvement in antioxidant defence and redox signalling. *Biochem. J.* *425*: 313–25.

Crewe, C., Kinter, M., and Szwedda, L.I. (2013). Rapid inhibition of pyruvate dehydrogenase: an initiating event in high dietary fat-induced loss of metabolic flexibility in the heart. *PLoS One* *8*: e77280.

Deroo, B.J., and Korach, K.S. (2006). Estrogen receptors and human disease. *J. Clin. Invest.* *116*: 561–70.

Dighe, A.S., and Sluss, P.M. (2004). Improved detection of serum estradiol after sample extraction procedure. *Clin. Chem.* *50*: 764–6.

Dong, Y., Zhang, M., Liang, B., Xie, Z., Zhao, Z., Asfa, S., et al. (2010). Reduction of AMP-activated protein kinase α 2 increases endoplasmic reticulum stress and atherosclerosis in vivo. *Circulation* *121*: 792–803.

Eckel, L.A. (2011). The ovarian hormone estradiol plays a crucial role in the control of food intake in females. *Physiol. Behav.* *104*: 517–24.

Elgass, K., Pakay, J., Ryan, M.T., and Palmer, C.S. (2013). Recent advances into the understanding of mitochondrial fission. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* *1833*: 150–161.

- Esterbauer, H., Schaur, R.J., and Zollner, H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.* *11*: 81–128.
- Fan, M.-J., Huang-Liu, R., Shen, C.-Y., Ju, D.-T., Lin, Y.-M., Pai, P., et al. (2014). Reduction of TLR4 mRNA stability and protein expressions through inhibiting cytoplasmic translocation of HuR transcription factor by E₂ and/or ER α in LPS-treated H9c2 cardiomyoblast cells. *Chin. J. Physiol.* *57*: 8–18.
- Fan, W., and Evans, R. (2015). PPARs and ERRs: molecular mediators of mitochondrial metabolism. *Curr. Opin. Cell Biol.* *33*: 49–54.
- Fernandez-Marcos, P.J., and Auwerx, J. (2011). Regulation of PGC-1, a nodal regulator of mitochondrial biogenesis. *Am. J. Clin. Nutr.* *93*: 884S–890S.
- Fernández-Silva, P., Enriquez, J.A., and Montoya, J. (2003). Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA. *Exp. Physiol.* *88*: 41–56.
- Fillmore, N., Mori, J., and Lopaschuk, G.D. (2014). Mitochondrial fatty acid oxidation alterations in heart failure, ischaemic heart disease and diabetic cardiomyopathy. *Br. J. Pharmacol.* *171*: 2080–90.
- Finck, B.N., Lehman, J.J., Leone, T.C., Welch, M.J., Bennett, M.J., Kovacs, A., et al. (2002). The cardiac phenotype induced by PPAR α overexpression mimics that caused by diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.* *109*: 121–130.
- Foryst-Ludwig, A., and Kintscher, U. (2010). Metabolic impact of estrogen signalling through ER α and ER β . *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *122*: 74–81.
- Fossati, P., and Prencipe, L. (1982). Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clin. Chem.* *28*: 2077–80.
- Francesco, E.M. De, Angelone, T., Pasqua, T., Pupo, M., Cerra, M.C., and Maggolini, M. (2013). GPER mediates cardiotropic effects in spontaneously hypertensive rat hearts. *PLoS One* *8*: e69322.
- Fuentes-Antrás, J., Ioan, A.M., Tuñón, J., Egado, J., and Lorenzo, O. (2014). Activation of toll-like receptors and inflammasome complexes in the diabetic cardiomyopathy-associated inflammation. *Int. J. Endocrinol.* *2014*: 847827.
- Garg, A. (2006). Adipose tissue dysfunction in obesity and lipodystrophy. *Clin. Cornerstone* *8 Suppl 4*: S7–S13.
- Gómez-Pérez, Y., Amengual-Cladera, E., Català-Niell, A., Thomàs-Moyà, E., Gianotti, M., Proenza, A.M., et al. (2008). Gender dimorphism in high-fat-diet-induced insulin resistance in skeletal muscle of aged rats. *Cell. Physiol. Biochem.* *22*: 539–48.

Gray, S., and Kim, J.K. (2011). New insights into insulin resistance in the diabetic heart. *Trends Endocrinol. Metab.* 22: 394–403.

Guevara, R., Santandreu, F.M., Valle, A., Gianotti, M., Oliver, J., and Roca, P. (2009). Sex-dependent differences in aged rat brain mitochondrial function and oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 46: 169–75.

Haffar, T., Bérubé-Simard, F.-A., and Bousette, N. (2015). Cardiomyocyte lipotoxicity is mediated by Il-6 and causes down-regulation of PPARs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 459: 54–59.

Hardie, D.G., Ross, F. a., and Hawley, S. a. (2012). AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13: 251–262.

Hattori, Y., Suzuki, K., Hattori, S., and Kasai, K. (2006). Metformin inhibits cytokine-induced nuclear factor kappaB activation via AMP-activated protein kinase activation in vascular endothelial cells. *Hypertension* 47: 1183–8.

Hawley, S.A., Fullerton, M.D., Ross, F.A., Schertzer, J.D., Chevtzoff, C., Walker, K.J., et al. (2012). The ancient drug salicylate directly activates AMP-activated protein kinase. *Science* 336: 918–22.

Hickson-Bick, D.L., Buja, L.M., and McMillin, J.B. (2000). Palmitate-mediated alterations in the fatty acid metabolism of rat neonatal cardiac myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 32: 511–9.

Holt, I.J., and Reyes, A. (2012). Human mitochondrial DNA replication. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4.:

Hou, X., and Pei, F. (2015). Estradiol Inhibits Cytokine-Induced Expression of VCAM-1 and ICAM-1 in Cultured Human Endothelial Cells Via AMPK/PPAR α Activation. *Cell Biochem. Biophys.* 72: 709–717.

Hsieh, Y.-C., Yang, S., Choudhry, M.A., Yu, H.-P., Rue, L.W., Bland, K.I., et al. (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: H2665–72.

Hu, L., Zhou, L., Wu, X., Liu, C., Fan, Y., and Li, Q. (2014). Hypoxic preconditioning protects cardiomyocytes against hypoxia/reoxygenation injury through AMPK/eNOS/PGC-1 α signaling pathway. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 7: 7378–88.

Huss, J.M., Imahashi, K., Dufour, C.R., Weinheimer, C.J., Courtois, M., Kovacs, A., et al. (2007). The nuclear receptor ERR α is required for the bioenergetic and functional adaptation to cardiac pressure overload. *Cell Metab.* 6: 25–37.

- Igata, M., Motoshima, H., Tsuruzoe, K., Kojima, K., Matsumura, T., Kondo, T., et al. (2005). Adenosine monophosphate-activated protein kinase suppresses vascular smooth muscle cell proliferation through the inhibition of cell cycle progression. *Circ. Res.* *97*: 837–44.
- Irazusta, V., Moreno-Cermeño, A., Cabisco, E., Tamarit, J., and Ros, J. (2010). Proteomic strategies for the analysis of carbonyl groups on proteins. *Curr. Protein Pept. Sci.* *11*: 652–8.
- Jankowski, M., Rachelska, G., Donghao, W., McCann, S.M., and Gutkowska, J. (2001). Estrogen receptors activate atrial natriuretic peptide in the rat heart. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*: 11765–70.
- Javadov, S., Jang, S., and Agostini, B. (2014). Crosstalk between mitogen-activated protein kinases and mitochondria in cardiac diseases: therapeutic perspectives. *Pharmacol. Ther.* *144*: 202–25.
- Jenke, A., Wilk, S., Poller, W., Eriksson, U., Valaperti, A., Rauch, B.H., et al. (2013). Adiponectin protects against Toll-like receptor 4-mediated cardiac inflammation and injury. *Cardiovasc. Res.* *99*: 422–31.
- Justo, R., Boada, J., Frontera, M., Oliver, J., Bermúdez, J., and Gianotti, M. (2005). Gender dimorphism in rat liver mitochondrial oxidative metabolism and biogenesis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *289*: C372–8.
- Kanda, N., and Watanabe, S. (2004). 17beta-estradiol stimulates the growth of human keratinocytes by inducing cyclin D2 expression. *J. Invest. Dermatol.* *123*: 319–28.
- Kang, C., and Li Ji, L. (2012). Role of PGC-1 α signaling in skeletal muscle health and disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1271*: 110–7.
- Kim, J.K., Pedram, A., Razandi, M., and Levin, E.R. (2006). Estrogen prevents cardiomyocyte apoptosis through inhibition of reactive oxygen species and differential regulation of p38 kinase isoforms. *J. Biol. Chem.* *281*: 6760–7.
- Kimes, B.W., and Brandt, B.L. (1976). Properties of a clonal muscle cell line from rat heart. *Exp. Cell Res.* *98*: 367–81.
- Klinge, C.M. (2008). Estrogenic control of mitochondrial function and biogenesis. *J. Cell. Biochem.* *105*: 1342–51.
- Knowlton, A.A., and Korzick, D.H. (2014). Estrogen and the female heart. *Mol. Cell. Endocrinol.* *389*: 31–9.
- Kuzmicic, J., Campo, A. Del, López-Crisosto, C., Morales, P.E., Pennanen, C., Bravo-Sagua, R., et al. (2011). [Mitochondrial dynamics: a potential new therapeutic target for heart failure]. *Rev. Española Cardiol.* *64*: 916–23.

- Lee, H.-C., and Wei, Y.-H. (2005). Mitochondrial biogenesis and mitochondrial DNA maintenance of mammalian cells under oxidative stress. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *37*: 822–34.
- Li, X., Fang, P., Mai, J., Choi, E.T., Wang, H., and Yang, X. (2013). Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. *J. Hematol. Oncol.* *6*: 19.
- Li, Y. (2013). Palmitate induces H9c2 cell apoptosis by increasing reactive oxygen species generation and activation of the ERK1/2 signaling pathway. *Mol. Med. Rep.* *7*: 855–61.
- Lin, S.-J., Shyue, S.-K., Liu, P.-L., Chen, Y.-H., Ku, H.-H., Chen, J.-W., et al. (2004). Adenovirus-mediated overexpression of catalase attenuates oxLDL-induced apoptosis in human aortic endothelial cells via AP-1 and C-Jun N-terminal kinase/extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *36*: 129–39.
- Liu, C.-J., Lo, J.-F., Kuo, C.-H., Chu, C.-H., Chen, L.-M., Tsai, F.-J., et al. (2009). Akt mediates 17beta-estradiol and/or estrogen receptor-alpha inhibition of LPS-induced tumor necrosis factor-alpha expression and myocardial cell apoptosis by suppressing the JNK1/2-NFkappaB pathway. *J. Cell. Mol. Med.* *13*: 3655–67.
- Liu, F., Xia, Y., Parker, A.S., and Verma, I.M. (2012). IKK biology. *Immunol. Rev.* *246*: 239–53.
- Liu, J., Chang, F., Li, F., Fu, H., Wang, J., Zhao, J., et al. (2015). Palmitate promotes autophagy and apoptosis through ROS-dependent JNK and p38 MAPK. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *463*: 262–7.
- Liu, J.W., Dawson, D.D., Peters, C.E., Baker, M.A., and Walker, A.M. (1997). Estrogen replacement in ovariectomized rats results in physiologically significant levels of circulating progesterone, and co-administration of progesterone markedly reduces the circulating estrogen. *Endocrine* *6*: 125–31.
- Lizotte, E., Grandy, S.A., Tremblay, A., Allen, B.G., and Fiset, C. (2009). Expression, Distribution and Regulation of Sex Steroid Hormone Receptors in Mouse Heart. *Cell. Physiol. Biochem.* *23*: 075–086.
- Lopaschuk, G.D., Ussher, J.R., Folmes, C.D.L., Jaswal, J.S., and Stanley, W.C. (2010). Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiol. Rev.* *90*: 207–58.
- López-Lluch, G., Irusta, P.M., Navas, P., and Cabo, R. de (2008). Mitochondrial biogenesis and healthy aging. *Exp. Gerontol.* *43*: 813–819.

- Lorenzo, O., Ramírez, E., Picatoste, B., Egido, J., and Tuñón, J. (2013). Alteration of energy substrates and ROS production in diabetic cardiomyopathy. *Mediators Inflamm.* *2013*: 461967.
- Mandavia, C.H., Aroor, A.R., Demarco, V.G., and Sowers, J.R. (2013). Molecular and metabolic mechanisms of cardiac dysfunction in diabetes. *Life Sci.* *92*: 601–8.
- Marin-Garcia, J., Ananthakrishnan, R., and Goldenthal, M.J. (2000). Heart mitochondrial DNA and enzyme changes during early human development. *Mol. Cell. Biochem.* *210*: 47–52.
- McBride, H.M., Neuspiel, M., and Wasiak, S. (2006). Mitochondria: more than just a powerhouse. *Curr. Biol.* *16*: R551–60.
- McKenney, R.L., and Short, D.K. (2011). Tipping the Balance: the Pathophysiology of Obesity and Type 2 Diabetes Mellitus. *Surg. Clin. North Am.* *91*: 1139–1148.
- Meng, R.-S., Pei, Z., Yin, R., Zhang, C.-X., Chen, B.-L., Zhang, Y., et al. (2009). Adenosine monophosphate-activated protein kinase inhibits cardiac hypertrophy through reactivating peroxisome proliferator-activated receptor- α signaling pathway. *Eur. J. Pharmacol.* *620*: 63–70.
- Meyer, S., Meer, P. van der, Tintelen, J.P. van, and Berg, M.P. van den (2014). Sex differences in cardiomyopathies. *Eur. J. Heart Fail.* *16*: 238–247.
- Mikkola, T.S., Gissler, M., Merikukka, M., Tuomikoski, P., and Ylikorkala, O. (2013). Sex differences in age-related cardiovascular mortality. *PLoS One* *8*: e63347.
- Monteiro, R., Teixeira, D., and Calhau, C. (2014). Estrogen signaling in metabolic inflammation. *Mediators Inflamm.* *2014*: 615917.
- Montessuit, C., and Lerch, R. (2013). Regulation and dysregulation of glucose transport in cardiomyocytes. *Biochim. Biophys. Acta* *1833*: 848–56.
- Mooradian, A.D. (1993). Antioxidant properties of steroids. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *45*: 509–11.
- Morgan, M.J., and Liu, Z. (2011). Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. *Cell Res.* *21*: 103–15.
- Murphy, M.P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* *417*: 1–13.
- Nabben, M., and Hoeks, J. (2008). Mitochondrial uncoupling protein 3 and its role in cardiac- and skeletal muscle metabolism. *Physiol. Behav.* *94*: 259–69.

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

Nadal-Casellas, A., Bauzá-Thorbrügge, M., Proenza, A.M., Gianotti, M., and Lladó, I. (2013). Sex-dependent differences in rat brown adipose tissue mitochondrial biogenesis and insulin signaling parameters in response to an obesogenic diet. *Mol. Cell. Biochem.* 373: 125–35.

Nagamine, M.K., Silva, T.C. da, Matsuzaki, P., Pinello, K.C., Cogliati, B., Pizzo, C.R., et al. (2009). Cytotoxic effects of butanolic extract from *Pfaffia paniculata* (Brazilian ginseng) on cultured human breast cancer cell line MCF-7. *Exp. Toxicol. Pathol.* 61: 75–82.

Nakano, K., Tarashima, M., Tachikawa, E., Noda, N., Nakayama, T., Sasaki, K., et al. (2005). Platelet mitochondrial evaluation during cytochrome c and dichloroacetate treatments of MELAS. *Mitochondrion* 5: 426–433.

Nanayakkara, G., Kariharan, T., Wang, L., Zhong, J., and Amin, R. (2012). The cardio-protective signaling and mechanisms of adiponectin. *Am. J. Cardiovasc. Dis.* 2: 253–66.

Nilsson, B.-O., Olde, B., and Leeb-Lundberg, L.M.F. (2011). G protein-coupled oestrogen receptor 1 (GPER1)/GPR30: a new player in cardiovascular and metabolic oestrogenic signalling. *Br. J. Pharmacol.* 163: 1131–9.

Ninomiya-Tsuji, J., Kishimoto, K., Hiyama, A., Inoue, J., Cao, Z., and Matsumoto, K. (1999). The kinase TAK1 can activate the NIK-I kappaB as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway. *Nature* 398: 252–6.

Nobuhara, M., Saotome, M., Watanabe, T., Urushida, T., Katoh, H., Satoh, H., et al. (2013). Mitochondrial dysfunction caused by saturated fatty acid loading induces myocardial insulin-resistance in differentiated H9c2 myocytes: a novel ex vivo myocardial insulin-resistance model. *Exp. Cell Res.* 319: 955–66.

O'Neill, L.A.J. (2008). The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: 10 years of progress. *Immunol. Rev.* 226: 10–8.

Oda, N., Imamura, S., Fujita, T., Uchida, Y., Inagaki, K., Kakizawa, H., et al. (2008). The ratio of leptin to adiponectin can be used as an index of insulin resistance. *Metabolism.* 57: 268–73.

Ong, S.-B., and Hausenloy, D.J. (2010). Mitochondrial morphology and cardiovascular disease. *Cardiovasc. Res.* 88: 16–29.

Orelia, C., and Dzierzak, E. (2007). Expression analysis of the TAB2 protein in adult mouse tissues. *Inflamm. Res.* 56: 98–104.

Ostadal, B., Netuka, I., Maly, J., Besik, J., and Ostadalova, I. (2009). Gender Differences in Cardiac Ischemic Injury and Protection--Experimental Aspects. *Exp. Biol. Med.* *234*: 1011–1019.

Palomer, X., Salvadó, L., Barroso, E., and Vázquez-Carrera, M. (2013). An overview of the crosstalk between inflammatory processes and metabolic dysregulation during diabetic cardiomyopathy. *Int. J. Cardiol.* *168*: 3160–72.

Pappachan, J.M., Varughese, G.I., Sriraman, R., and Arunagirinathan, G. (2013). Diabetic cardiomyopathy: Pathophysiology, diagnostic evaluation and management. *World J. Diabetes* *4*: 177–89.

Parker-Duffen, J.L., and Walsh, K. (2014). Cardiometabolic effects of adiponectin. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* *28*: 81–91.

Pavón, N., Martínez-Abundis, E., Hernández, L., Gallardo-Pérez, J.C., Alvarez-Delgado, C., Cerbón, M., et al. (2012). Sexual hormones: effects on cardiac and mitochondrial activity after ischemia-reperfusion in adult rats. Gender difference. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *132*: 135–46.

Peura, J.L., and Schaffer, J.E. (2015). Lipotoxicity in cardiac and skeletal muscle. *Hear. Metab.* *30*: 4–6.

Piquereau, J., Caffin, F., Novotova, M., Lemaire, C., Veksler, V., Garnier, A., et al. (2013). Mitochondrial dynamics in the adult cardiomyocytes: which roles for a highly specialized cell? *Front. Physiol.* *4*: 102.

Plante, B.J., Lessey, B.A., Taylor, R.N., Wang, W., Bagchi, M.K., Yuan, L., et al. (2012). G protein-coupled estrogen receptor (GPER) expression in normal and abnormal endometrium. *Reprod. Sci.* *19*: 684–93.

Porter, G.A., Hom, J., Hoffman, D., Quintanilla, R., Mesy Bentley, K. de, and Sheu, S.-S. (2011). Bioenergetics, mitochondria, and cardiac myocyte differentiation. *Prog. Pediatr. Cardiol.* *31*: 75–81.

Poulsen, L. la C., Siersbæk, M., and Mandrup, S. (2012). PPARs: fatty acid sensors controlling metabolism. *Semin. Cell Dev. Biol.* *23*: 631–9.

Prossnitz, E.R., and Barton, M. (2011). The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease. *Nat. Rev. Endocrinol.* *7*: 715–26.

Prossnitz, E.R., and Barton, M. (2014). Estrogen biology: new insights into GPER function and clinical opportunities. *Mol. Cell. Endocrinol.* *389*: 71–83.

Qi, D., and Young, L.H. (2015). AMPK: energy sensor and survival mechanism in the ischemic heart. *Trends Endocrinol. Metab.* *26*: 422–9.

- Quick, K.L., Hardt, J.I., and Dugan, L.L. (2000). Rapid microplate assay for superoxide scavenging efficiency. *J. Neurosci. Methods* 97: 139–44.
- Randle, P.J., Garland, P.B., Hales, C.N., and Newshome, E.A. (1963). The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* 1: 785–9.
- Rattanasopa, C., Phungphong, S., Wattanapermpool, J., and Bupha-Intr, T. (2015). Significant role of estrogen in maintaining cardiac mitochondrial functions. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 147: 1–9.
- Ray, A., Prefontaine, K.E., and Ray, P. (1994). Down-modulation of interleukin-6 gene expression by 17 beta-estradiol in the absence of high affinity DNA binding by the estrogen receptor. *J. Biol. Chem.* 269: 12940–6.
- Rowe, G.C., Jiang, A., and Arany, Z. (2010). PGC-1 coactivators in cardiac development and disease. *Circ. Res.* 107: 825–38.
- Rubler, S., Dlugash, J., Yuceoglu, Y.Z., Kumral, T., Branwood, A.W., and Grishman, A. (1972). New type of cardiomyopathy associated with diabetic glomerulosclerosis. *Am. J. Cardiol.* 30: 595–602.
- Saccani, S., Pantano, S., and Natoli, G. (2002). p38-Dependent marking of inflammatory genes for increased NF-kappa B recruitment. *Nat. Immunol.* 3: 69–75.
- Saha, J.K., Xia, J., Grondin, J.M., Engle, S.K., and Jakubowski, J.A. (2005). Acute hyperglycemia induced by ketamine/xylazine anesthesia in rats: mechanisms and implications for preclinical models. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*. 230: 777–84.
- Saks, V.A., Veksler, V.I., Kuznetsov, A. V, Kay, L., Sikk, P., Tiiel, T., et al. (1998). Permeabilized cell and skinned fiber techniques in studies of mitochondrial function in vivo. *Mol. Cell. Biochem.* 184: 81–100.
- Salt, I.P., and Palmer, T.M. (2012). Exploiting the anti-inflammatory effects of AMP-activated protein kinase activation. *Expert Opin. Investig. Drugs* 21: 1155–67.
- Sansbury, B.E., and Hill, B.G. (2014). Regulation of obesity and insulin resistance by nitric oxide. *Free Radic. Biol. Med.* 73: 383–99.
- Santos, C.X.C., Anilkumar, N., Zhang, M., Brewer, A.C., and Shah, A.M. (2011). Redox signaling in cardiac myocytes. *Free Radic. Biol. Med.* 50: 777–93.
- Scarpulla, R.C. (2008). Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiol. Rev.* 88: 611–38.
- Scarpulla, R.C., Vega, R.B., and Kelly, D.P. (2012). Transcriptional integration of mitochondrial biogenesis. *Trends Endocrinol. Metab.* 23: 459–66.

- Schilling, J.D. (2015). The mitochondria in diabetic heart failure: from pathogenesis to therapeutic promise. *Antioxid. Redox Signal.* 22: 1515–26.
- Schulz, E., Dopheide, J., Schuhmacher, S., Thomas, S.R., Chen, K., Daiber, A., et al. (2008). Suppression of the JNK pathway by induction of a metabolic stress response prevents vascular injury and dysfunction. *Circulation* 118: 1347–57.
- Selvaraju, V., Joshi, M., Suresh, S., Sanchez, J.A., Maulik, N., and Maulik, G. (2012). Diabetes, oxidative stress, molecular mechanism, and cardiovascular disease--an overview. *Toxicol. Mech. Methods* 22: 330–5.
- Siti, H.N., K, Y., and J, K. (2015). The Role of Oxidative Stress, Antioxidants and Vascular Inflammation in Cardiovascular Disease (A Review). *Vascul. Pharmacol.* 71: 40–56.
- Smith, A.D., Morris, V.C., and Levander, O.A. (2001). Rapid determination of glutathione peroxidase and thioredoxin reductase activities using a 96-well microplate format: comparison to standard cuvette-based assays. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 71: 87–92.
- Stirone, C., Duckles, S.P., Krause, D.N., and Procaccio, V. (2005). Estrogen increases mitochondrial efficiency and reduces oxidative stress in cerebral blood vessels. *Mol. Pharmacol.* 68: 959–65.
- Sugden, M.C., and Holness, M.J. (2006). Mechanisms underlying regulation of the expression and activities of the mammalian pyruvate dehydrogenase kinases. *Arch. Physiol. Biochem.* 112: 139–49.
- Sung, M.M., Hamza, S.M., and Dyck, J.R.B. (2015). Myocardial Metabolism in Diabetic Cardiomyopathy: Potential Therapeutic Targets. *Antioxid. Redox Signal.* 22: 1606–30.
- Taanman, J.W. (1999). The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochim. Biophys. Acta* 1410: 103–23.
- Taha, M., and Lopaschuk, G.D. (2007). Alterations in energy metabolism in cardiomyopathies. *Ann. Med.* 39: 594–607.
- Tang, G., Minemoto, Y., Dibling, B., Purcell, N.H., Li, Z., Karin, M., et al. (2001). Inhibition of JNK activation through NF-kappaB target genes. *Nature* 414: 313–7.
- Tao, R., Gong, J., Luo, X., Zang, M., Guo, W., Wen, R., et al. (2010). AMPK exerts dual regulatory effects on the PI3K pathway. *J. Mol. Signal.* 5: 1.
- Tepavčević, S., Vojnović Milutinović, D., Macut, D., Žakula, Z., Nikolić, M., Božić-Antić, I., et al. (2014). Dihydrotestosterone deteriorates cardiac insulin signaling and glucose transport in the rat model of polycystic ovary syndrome. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 141: 71–6.

Thomas, P.S., and Farquhar, M.N. (1978). Specific measurement of DNA in nuclei and nucleic acids using diaminobenzoic acid. *Anal. Biochem.* *89*: 35–44.

Towler, M.C., and Hardie, D.G. (2007). AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling. *Circ. Res.* *100*: 328–41.

Turdi, S., Huff, A.F., Pang, J., He, E.Y., Chen, X., Wang, S., et al. (2014). 17- β estradiol attenuates ovariectomy-induced changes in cardiomyocyte contractile function via activation of AMP-activated protein kinase. *Toxicol. Lett.* *232*: 253–262.

Valle, A., Guevara, R., Garcia-Palmer, F.J., Roca, P., and Oliver, J. (2007). Sexual dimorphism in liver mitochondrial oxidative capacity is conserved under caloric restriction conditions. *AJP Cell Physiol.* *293*: C1302–C1308.

Vega, R.B., Horton, J.L., and Kelly, D.P. (2015). Maintaining Ancient Organelles: Mitochondrial Biogenesis and Maturation. *Circ. Res.* *116*: 1820–1834.

Velarde, M.C. (2014). Mitochondrial and sex steroid hormone crosstalk during aging. *Longev. Heal.* *3*: 2.

Villarreal-Molina, M.T., and Antuna-Puente, B. (2012). Adiponectin: anti-inflammatory and cardioprotective effects. *Biochimie* *94*: 2143–9.

Virtue, S., and Vidal-Puig, A. (2010). Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome - An allostatic perspective. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* *1801*: 338–349.

Voorde, J. Van de, Pauwels, B., Boydens, C., and Decaluwé, K. (2013). Adipocytokines in relation to cardiovascular disease. *Metabolism.* *62*: 1513–21.

Wang, T., McDonald, C., Petrenko, N.B., Leblanc, M., Wang, T., Giguere, V., et al. (2015a). Estrogen-related receptor α (ERR α) and ERR γ are essential coordinators of cardiac metabolism and function. *Mol. Cell. Biol.* *35*: 1281–98.

Wang, Y.-C., Xiao, X.-L., Li, N., Yang, D., Xing, Y., Huo, R., et al. (2015b). Oestrogen inhibits BMP4-induced BMP4 expression in cardiomyocytes: a potential mechanism of oestrogen-mediated protection against cardiac hypertrophy. *Br. J. Pharmacol.* n/a–n/a.

Wu, Z., Huang, X., Feng, Y., Handschin, C., Feng, Y., Gullicksen, P.S., et al. (2006). Transducer of regulated CREB-binding proteins (TORCs) induce PGC-1 α transcription and mitochondrial biogenesis in muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*: 14379–84.

Xu, Y., Arenas, I.A., Armstrong, S.J., and Davidge, S.T. (2003). Estrogen modulation of left ventricular remodeling in the aged heart. *Cardiovasc. Res.* *57*: 388–94.

Yang, J., and Holman, G.D. (2005). Insulin and contraction stimulate exocytosis, but increased AMP-activated protein kinase activity resulting from oxidative metabolism stress slows endocytosis of GLUT4 in cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.* *280*: 4070–8.

Zhang, L., He, H., and Balschi, J.A. (2007). Metformin and phenformin activate AMP-activated protein kinase in the heart by increasing cytosolic AMP concentration. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *293*: H457–66.

Zhang, Y., Qiu, J., Wang, X., and Xia, M. (2011). AMP-Activated Protein Kinase Suppresses Endothelial Cell Inflammation Through Phosphorylation of Transcriptional Coactivator p300. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *31*: 2897–2908.

Zinovkin, R.A., Romaschenko, V.P., Galkin, I.I., Zakharova, V. V, Pletjushkina, O.Y., Chernyak, B. V, et al. (2014). Role of mitochondrial reactive oxygen species in age-related inflammatory activation of endothelium. *Aging (Albany. NY).* *6*: 661–74.

Zippel, N., Malik, R.A., Frömel, T., Popp, R., Bess, E., Strilic, B., et al. (2013). Transforming growth factor- β -activated kinase 1 regulates angiogenesis via AMP-activated protein kinase- α 1 and redox balance in endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *33*: 2792–9.

"Tota història és una història interminable."

Michael Ende, La Història Interminable