



Universitat
de les Illes Balears

TESI DOCTORAL
2017

**ELS ESTRÒGENS COM A MODULADORS DE LA
FUNCIÓ I LA BIOGÈNESI MITOCONDRIALS DEL
FETGE. RELACIÓ AMB L'ESTEATOSI HEPÀTICA
I LA RESISTÈNCIA A LA INSULINA**

Isabel Maria Galmés Pascual



Universitat
de les Illes Balears

TESI DOCTORAL
2017

Programa oficial de Doctorat en Nutrició Humana

**ELS ESTRÒGENS COM A MODULADORS DE LA
FUNCIÓ I LA BIOGÈNESI MITOCONDRIALS DEL
FETGE. RELACIÓ AMB L'ESTEATOSI HEPÀTICA
I LA RESISTÈNCIA A LA INSULINA**

Isabel Maria Galmés Pascual

Directores:

Dra. Magdalena Gianotti Bauzá

Dra. Isabel Lladó Sampol

Doctora per la Universitat de les Illes Balears

Amb el vistiplau de les Directores

Dra. Magdalena Gianotti Bauzá
Catedràtica d'Universitat

Dra. Isabel Lladó Sampol
Catedràtica d'Universitat

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

La interessada

Isabel Maria Galmés Pascual

Sí vols viure el que somies,
has de començar somiant

Txarago, Camp de batalla

Agraïments

El camí per arribar a la cima de la tesi doctoral no és un trajecte directe i amb seient de primera classe. No es fa en poques hores i no sempre surt el sol. És un viatge ple de reptes, de voltes en cercle, de passes cap a enrere, i d'arbres que no et deixen veure el bosc. Però quan arribes dalt de tot i fas la vista enrere, te'n adones que allò que es diu sobre que tot esforç té la seva recompensa és cert. Que tant caminar t'ha fet gran i més fort que mai, i que ets sents preparada per pujar altres muntanyes. Però tota travessa es fa una mica menys costa amunt quan tens una mà que t'estira i t'ajuda a avançar.

Aquesta tesi no hauria estat possible sense l'ajuda de les meves directores, les doctores Magdalena Gianotti i Bel Lladó. Gràcies per ser la meva brúixola, per trobar el moment per jo, pels vostres múltiples consells, per fer-me entendre la bioquímica com un cercle interconnectat. I especialment per l'esforç que heu fet els darrers mesos. També vull donar les gràcies a la doctora Ana Proenza, per ser part d'aquest viatge i estar sempre disposada a ajudar-me. I al doctor Francisco José García. Paco, et puc imaginar dient-me "Enhorabona, nina", i regalant-me un dels teus somriures infinits. Et trobem a faltar cada dia. També a la doctora Pilar Roca i als doctors Jordi Oliver i Ádamo Valle. Ha estat un plaer compartir aquesta etapa de la meua vida amb tots vosaltres.

No voldria oblidar-me dels oficials de laboratori, dels serveis administratius o del servei de neteja, que sense vosaltres la feina s'hauria multiplicat per mil. I a en Tomeu del bar per tots els cafès, berenars i dinars que m'ha preparat.

Aquesta tesi va dedicada en gran part als companys de laboratori; als que em van rebre i als que heu anat arribant de mica en mica. Seria un error dir-vos companys, perquè sou uns vertaders amics. Heu estat un motor indispensable per seguir endavant. No sols per l'ajuda dins el laboratori, sinó també per molts altres moments que hem viscut plegats. Converses, visites al bar, debats de *Game of Thrones*, congressos, *muro de los horrores*, *labo-betlems*, bromes per telèfon (això no tan divertit), i moltes anècdotes més!

Als meus germans GMEIN. Als que heu estat amb jo gairebé tot aquest viatge, pipeta en mà: Miquelet i Marco. Gràcies per ensenyar-me tot el que sabíeu i per fer-me sentir un membre més de l'equip. No podria haver tingut millors mestres! A tu Gabriela, que encara que pensés que eres un poc exigent, he acabat adoptant moltíssimes de les teves "manies" i ara penso que eren necessàries en la nostra feina. Als meus germans petits, Melanie i Agustí. No tinc cap dubte que fareu unes tesis precioses; ja m'agradaria haver estat tant espavilada com vosaltres quan vaig començar. Melanie, mil gràcies per la teua ajuda durant la recta final, i al teu home per la portada tan fantàstica! A n'Antònia Nadal i als altres veterans del grup, que van descriure els

antecedents d'aquesta tesi doctoral. Si d'alguna cosa em puc sentir orgullosa és del gran equip que formem els GMEIN.

També voldria fer menció als altres companys per tot el que m'han aportat. Jordi Sastre, ets totalment imprescindible! De tu he après molt i em puc donar per satisfeta si jo he estat la meitat de bona germana gran del que has sigut tu per mi. Dani, mi *tràmbol* preferit! Aconsegueixes fer-me oblidar dels maldecaps amb el teu somriure. Mercedes, poca gent és tant guapa com tu! Valenta, optimista i alegre són adjectius que se't queden curts. Mdm, encara recordo quan et cercava el primer dia de carrera dins l'aula... i mira fins on hem arribat! Gràcies per compartir aquest llarg camí amb jo. A tu Lida, per tenir les idees tan clares i saber lo complicat que pot ser comprar un *potter*. *Reyniel, hemos compartido poco tiempo juntos, pero suficiente para ver que tienes un gran corazón. ¡Sigue siempre adelante!* Miquelot *mechón*, seràs el futur catedràtic de la universitat de Xile! Has demostrat que pots arribar allà on et proposis. Als *mortífags* fidels a la *marca tenebrosa*. Xavi, ets un pesat amb el futbol, no convides mai a pop, em dius Isa, etc., però així i tot encara ho compenses... Te puc tapar! Carla *Little forest* (poni), has estat el meu llumet d'alegria, de mil riures i de confidències. No hauria estat el mateix sense tu, he guanyat una gran amiga per tota la vida. *Spasiba*.

A les meves millors amigues, Marga i Bàrbara. M'heu animat per fer front als nous reptes i heu estat sempre devora jo. No podria entendre una vida sense vosaltres; *Cufis, better together!* Al *biotim*, per aconseguir que el pas per la universitat fos més divertit des del minut 1: Toni, Joan, Xavi, Dani, Mdm, Marga (*Milflores*, ja falta menys pel viatge màgic), BelBru (vaja cosina de cosins més guapa que tenc!) i Sonia (*bebè* per excel·lència, impossible avorrir-se amb tu!). Als demés amics, que també han estat allà quan els he necessitat: Alex, Pep i Mateu (no podeu ser més *frikis*, però m'encantau!); Barita i Cati (*uapis*, els vinets amb vosaltres no els canviaria per res). (...)

A la meva família, que m'acompanya al meu dia a dia. Als meus pares, que encara pensen que fer la tesi ha estat estudiar i que han viscut de prop les dificultats que se m'han presentat, sobretot durant el darrer any. Si he arribat fins aquí és perquè mai m'ha faltat de res. A tu *Jana*, per equilibrar-me i fer-me més forta; i a tu Jaume, pel teu recolzament i vitalitat. Aviat podreu fer una partida de *Trivial* amb una doctora. I a tu Fosc, amic fidel de quatre potes, que em treus somriures cada dia.

Mil gràcies a tots ♥,
Bel

La present tesi doctoral s'ha dut 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 Centro de Investigación Biomédica en Red Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBERobn) del Instituto de Salud Carlos III (CB06/03/0043), i de l'Institut d'Investigació Sanitària Illes Balears (IdISBa). Aquest treball ha estat possible gràcies al projecte d'investigació SAF2010-21792 finançat per la Direcció General d'Investigació i Gestió del Pla Nacional de I+D+I del Govern Espanyol, i a ajudes de la Comunitat Autònoma de les Illes Balears cofinançades amb els fons FEDER (31/2011, AAEE002/2012, AAEE43/2014 i AAEE42/2015). La doctoranda ha gaudit d'una beca predoctoral concedida pel Ministeri d'Educació, Cultura i Esport (referència AP2012-1004).



Universitat
de les Illes Balears

iUNiCS
Institut Universitari d'Investigació en Ciències de la Salut

ciberobn
Centro de Investigación Biomédica en Red
Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición

Institut
d'Investigació Sanitària
Illes Balears



UNIÓ EUROPEA
Fons Europeu de
Desenvolupament Regional

Una manera de fer Europa



L'FSE inverteix en el teu futur

europa 
inverteix en el teu futur



G CONSELLERIA
O EDUCACIÓ
I I UNIVERSITAT
B

ÍNDEX

SIGLES I ACRÒNIMS	V
RESUM	IX
PUBLICACIONS DERIVADES DE LA TESI DOCTORAL	XV
1. INTRODUCCIÓ	1
1.1. METABOLISME HEPÀTIC	3
1.1.1. Metabolisme glucídic.....	5
1.1.2. Metabolisme lipídic	6
1.2. EL MITOCONDRI	9
1.2.1. El genoma mitocondrial.....	9
1.2.2. Biogènesi mitocondrial	10
1.2.3. Factors reguladors de la funció i la biogènesi mitocondrials	11
1.2.4. Cadena de transport electrònic i producció de ROS.....	17
1.2.5. La disfunció mitocondrial	20
1.3. ESTEATOSI HEPÀTICA	22
1.3.1. Acumulació lipídica hepàtica. Relació amb la resistència a la insulina	23
1.3.2. Inflamació hepàtica	26
1.3.3. Paper de l'AMPK als desordres hepàtics.....	28
1.3.4. Efectes protectors de les TZDs sobre la progressió de la NAFLD. Paper de l'adiponectina	30
1.4. DIMORFISME SEXUAL EN LA MALALTIA DEL FETGE GRAS I EN LA FUNCIO I LA BIOGENESI MITOCONDRIALS: PAPER DELS ESTRÒGENS	32
2. OBJECTIUS I PLANTEJAMENT EXPERIMENTAL	37
3. MATERIALS I MÈTODES	45
3.1. METODOLOGIA <i>IN VIVO</i>	47
3.1.1. Animals i tractaments.....	47
3.1.1.1. Experiment amb rates ovariectomitzades	47
3.1.1.2. Experiment amb rates alimentades amb dieta hiperlipídica i sotmeses a tractament farmacològic	48
3.1.2. Determinació de la tolerància a la glucosa	50
3.1.3. Sacrifici, obtenció i processament de mostres	51
3.1.4. Determinació dels lípids totals hepàtics	52
3.1.5. Determinació dels NEFAs hepàtics	52
3.1.6. Preparació dels homogenats hepàtics	53
3.1.7. Determinació dels nivells de TG i colesterol hepàtics	53
3.1.8. Determinació de la TAC hepàtica	54
3.1.9. Determinació d'activitats enzimàtiques	54
3.1.9.1. Activitat citocrom c oxidasa	54

3.1.9.2. Activitat citrat sintasa.....	56
3.1.9.3. Activitat superòxid dismutasa	57
3.1.9.4. Activitat fosfoenolpiruvat carboxicina.....	58
3.2. METODOLOGIA <i>IN VITRO</i>	60
3.2.1. Estudis amb hepatòcits HepG2	60
3.2.2. Procediments generals de cultius	61
3.2.2.1. Manteniment i subcultiu.....	61
3.2.2.2. Congelació i descongelació	62
3.2.2.3. Anàlisi de la contaminació dels cultius cel·lulars.....	63
3.2.3. Tractaments	64
3.2.3.1. Silenciament de l'expressió gènica.....	64
3.2.3.2. Preparació del palmitat	66
3.2.4. Determinació dels nivells intracel·lulars de lípids.....	67
3.2.5. Recollida de proteïnes per a Western blot	68
3.2.5.1. TriPure Isolation Reagent®	68
3.2.5.2. RIPA	69
3.2.6. Anàlisi de la viabilitat cel·lular	69
3.2.7. Determinació de la massa mitocondrial	70
3.2.8. Determinació del potencial de membrana mitocondrial.....	70
3.2.9. Determinació del contingut d'ATP	71
3.2.10. Determinació dels nivells de ROS.....	71
3.3. METODOLOGIA GENERAL.....	72
3.3.1. Determinació de la concentració de proteïnes.....	72
3.3.1.1. Mètode de Bradford	72
3.3.1.2. Mètode de l'àcid bicinoninic	72
3.3.1.3. Quantificació per absorbància a 280 nm	73
3.3.2. Western blot.....	73
3.3.3. Quantificació dels grup carbonils a proteïnes	77
3.3.4. Determinació de la peroxidació lipídica	78
3.3.5. Obtenció del DNA.....	79
3.3.6. Obtenció del RNA	80
3.3.7. Determinació de l'expressió gènica	80
3.3.7.1. Retrotranscripció.....	80
3.3.7.2. PCR quantitativa.....	81
3.3.7.3. Anàlisi de l'eficiència i càlcul de l'expressió gènica	86
3.3.7.4. Anàlisi de l'especificitat de l'amplificació	86
3.4. ANÀLISI ESTADÍSTIC	88
3.4.1. Anàlisi estadístic dels resultats de l'experiment amb rates OVX.....	88
3.4.2. Anàlisi estadístic dels resultats de l'experiment amb rates alimentades amb dieta hiperlipídica i sotmeses a tractament farmacològic	88
3.4.3. Anàlisi estadístic dels resultats dels experiments amb cèl·lules HepG2 ...	88
4. RESULTATS I DISCUSSIÓ	91
4.1. EFECTES DELS ESTRÒGENS SOBRE LA FUNCIO I LA BIOGENESI MITOCONDRIALS DEL FETGE. IMPLICACIO DELS PGCS.....	93

4.1.1. Resultats	93
4.1.2. Discussió.....	104
4.2. EFECTES DELS ESTRÒGENS SOBRE LA REGULACIÓ DE L'ESTEATOSI HEPÀTICA, I LA SEVA RELACIÓ AMB LA MODULACIÓ DE LA FUNCIÓ I LA BIOGÈNESI MITOCONDRIALS I LA RESISTÈNCIA A LA INSULINA HEPÀTIQUES EN UN ENTORN LIPOTÒXIC.....	109
4.2.1. Caracterització dels models experimentals	109
4.2.2. Paper de l'AMPK com a intermediari en les accions de l'E2 sobre el metabolisme lipídic hepàtic	113
4.2.2.1. Resultats	113
4.2.2.2. Discussió	120
4.2.3. Implicació de l'E2 en la resistència hepàtica a la insulina en un entorn lipotòxic. Relació amb els efectes de l'hormona sobre la funció i la biogènesi mitocondrials	126
4.2.3.1. Resultats	126
4.2.3.2. Discussió	136
4.3. DIMORFISME SEXUAL EN ELS EFECTES DE LA ROSIGLITAZONA SOBRE L'ACUMULACIÓ DE LÍPIDS, LA RESISTÈNCIA A LA INSULINA I LA FUNCIÓ MITOCONDRIAL AL FETGE EN RESPOSTA A UNA SITUACIÓ LIPOTÒXICA. PAPER DE L'ADIPONECTINA	142
4.3.1. Resultats	142
4.3.2. Discussió.....	153
5. RECAPITULACIÓ.....	161
6. CONCLUSIONS.....	171
7. REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES	175
8. ANNEX 1. PUBLICACIÓ DERIVADA DE LA TESI DOCTORAL	195
17B-ESTRADIOL IMPROVES HEPATIC MITOCHONDRIAL BIOGENESIS AND FUNCTION THROUGH PGC1B	197
9. ANNEX 2. PUBLICACIONS COMPLEMENTÀRIES	211
ANTIOXIDANT PEROXIREDOXIN 3 EXPRESSION IS REGULATED BY 17BETA-ESTRADIOL IN RAT WHITE ADIPOSE TISSUE.....	213
GPER MEDIATES THE EFFECTS OF 17B-ESTRADIOL IN CARDIAC MITOCHONDRIAL BIOGENESIS AND FUNCTION	227
ESTRADIOL STIMULATES MITOCHONDRIAL BIOGENESIS AND ADIPONECTIN SYNTHESIS IN SKELETAL MUSCLE.....	239

SIGLES I ACRÒNIMS

ACC: acetil-CoA carboxilasa
ACOX: acil-CoA oxidasa 1
AdipoR: receptor 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
BCA: àcid bicinconinic
BSA: albúmina sèrica bovina
CD36/FAT: translocasa d'àcids grassos
ChREBP: element de resposta als carbohidrats
COX: citocrom c oxidasa
Cp: cicle llindar d'expressió
CPT1A: transferasa 1A de palmitoilcarnitina
CREB: proteïna d'unió a l'element de resposta a cAMP
CS: citrat sintasa
DAB: tetraclorur de 3,3'-diaminobenzidina
DAG: diacilglicerol
DCFH-DA: 2',7'-diclorofluoresceïna diacetat
DMSO: dimetilsulfòxid
DNP: 2,4-dinitrofenilhidrazina
ER: receptor d'estrògens
ERE: element de resposta a estrògens
E2: 17 β -estradiol
FABP: proteïna d'unió a àcids grassos
FAS: àcid gras sintasa
FATP: proteïna transportadora d'àcids grassos
FBS: sèrum fetal boví
FoxO1: proteïna de domini forkhead O1
GPOR: receptor d'estrògens associat a proteïnes G
GS: glucogen sintasa
GSK3: glucogen sintasa cinasa 3
G6P: glucosa-6-fosfat

G6Pasa: glucosa-6-fosfatasa
HDL-c: colesterol unit a lipoproteïnes d'alta densitat
HFD: dieta hiperlipídica
HMG-CoA: 3-hidroxi-3metilglutaril-CoA
HNF: factor nuclear hepatic
HNE: 4-hidroxinonenal
HOMA-IR: model homeostàtic d'estimació de la resistència a la insulina
IKK2: cinasa inhibidora d'I κ B
IRS: substrat receptor d'insulina
JNK: cinasa de l'extrem N-terminal de c-Jun
LDL-c: colesterol unit a lipoproteïnes de baixa densitat
L-GCK: glucocinasa hepàtica
LSD: mínima diferència significativa
MAPK: cinasa activada per mitògens
MCAD: deshidrogenasa d'acils-CoA de cadena mitjana
MEM: medi essencial mínim
MMP: potencial de membrana mitocondrial
mtDNA: DNA mitocondrial
MTP: proteïna de transferència de triglicèrids microsomal
NAFLD: malaltia del fetge gras no alcohòlic
NAO: 10-N-Nonil taronja d'acidilina
NASH: esteatohepatitis no alcohòlica
NEFA: àcid gras no esterificat
NF- κ B: factor nuclear κ B
NRF: factor nuclear de respiració
OVX: ovariectomitzat
PA: palmitat
PBS: tampó fosfat salí
PCR: reacció en cadena de la polimerasa
PEPCK: fosfoenolpiruvat carboxicinas
PGC-1 α , PGC-1 β : coactivadors 1 α i 1 β del receptor activat per proliferadors peroxisomals γ
PI3K: fosfatidilinositol 3-cinasa
PKC: proteïnasa cinasa C
PON1: paraoxonasa 1

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

PPRE: element de resposta als receptors activats per proliferadors peroxisomals

PRC: coactivador tipus PGC-1 α

PRX: peroxiredoxina

RISC: complex de silenciament induït per RNA

RNAi: RNA d'interferència

ROS: espècies reactives d'oxigen

Rsg: rosiglitazona

RXR: receptor X de retinoides

SDS: dodecilsulfat sòdic

SFA: àcid gras saturat

siRNA: petit RNA d'interferència

SOD: superòxid dismutasa

SREBP-1c: proteïna 1c d'unió a elements reguladors d'esterols

TAC: capacitat antioxidant total

TBS: tampó Tris-salí

TBS-T: TBS amb Tween 20

TFAM: factor de transcripció mitocondrial A

TFBM: factor de transcripció mitocondrial B

TG: triglicèrids

T_m: temperatura de fusió

TMRM: tetrametilrodamina metil èster

TNF- α : factor de necrosi tumoral α

TZD: tiazolidinediona

UCP: proteïna desacoblant

VLDL: lipoproteïna de molt baixa densitat

WAT: teixit adipós blanc



Universitat
de les Illes Balears

Els estrògens com a moduladors de la funció i la biogènesi mitocondrials del fetge. Relació amb l'esteatosi hepàtica i la resistència a la insulina

Tesi doctoral, Isabel Maria Galmés Pascual, 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 evidenciat l'existència d'un dimorfisme sexual en la funció i la biogènesi mitocondrials al fetge de rata, de manera que les femelles presenten mitocondris més diferenciats, amb major capacitat oxidativa i antioxidant. Tenint en compte aquests antecedents, l'objectiu d'aquesta tesi doctoral ha estat l'estudi del paper dels estrògens en la modulació de la funció i la biogènesi mitocondrials al fetge, fent èmfasi en la seva implicació en la millora de l'esteatosi i de la resistència a la insulina hepàtiques en una situació de lipotoxicitat. Per assolir aquest objectiu s'han utilitzat dos models *in vivo* amb rates Wistar: ovariectomitzades i suplementades amb 17 β -estradiol (E2), i d'ambdós sexes alimentades amb una dieta hiperlipídica (HFD) i tractades amb rosiglitazona (Rsg). Aquests estudis s'han complementat amb experiments *in vitro* amb hepatòcits HepG2.

L'ovariectomia empitjora la funció i la biogènesi mitocondrials, incrementa l'estrès oxidatiu i pertorba el metabolisme lipídic al fetge, alteracions que són restablertes, algunes parcialment, pel tractament dels animals amb E2. Els experiments en hepatòcits HepG2 demostren que l'estimulació de la funció mitocondrial per part de l'E2 té lloc principalment a través del coactivador transcripcional PGC-1 β , sent més susceptible a l'entorn hormonal que PGC-1 α . Així, es confirma la contribució de l'E2 al dimorfisme sexual en la funció i la biogènesi mitocondrials al fetge, la qual cosa estaria d'acord amb la menor incidència de desordres subjacents a la disfunció mitocondrial que presenta el sexe femení. La rellevància del PGC-1 β com a mediador dels efectes de l'E2 el converteix en una diana terapèutica potencial enfront dels desordres mitocondrials hepàtics.

Les rates femella, en comparació a les mascle, són més resistents als efectes perjudicials d'una HFD; presenten un millor perfil lipídic circulant i un menor grau d'esteatosi hepàtica. En resposta a l'elevada disponibilitat de combustibles lipídics, tant al fetge de les femelles com a les cèl·lules HepG2, es dona una regulació de l'expressió de gens implicats al metabolisme lipídic, que condueix a la disminució de l'acumulació intracel·lular de lípids. En aquestes circumstàncies, l'activació de l'AMPK hepàtica seria un mecanisme clau en la regulació del metabolisme lipídic per part de l'E2. A més, els efectes de l'E2 estimulants la funció i la biogènesi mitocondrials també es donen a l'hepatòcit en condicions de lipotoxicitat, i s'associen amb una millora de la sensibilitat a la insulina. D'aquesta manera, la reducció de la producció de ROS subjacent a la millora de la funció mitocondrial, provocaria una menor activació de vies inflamatòries com la de JNK, contribuint a la major sensibilitat hepàtica a la insulina observada a les femelles. Per la seva banda, les rates mascle són més sensibles al tractament amb Rsg, probablement com a conseqüència del major grau de disfunció metabòlica al fetge induït pel tractament dietètic. De fet, el tractament amb el fàrmac suposa una millora de la sensibilitat a la insulina i de la funció mitocondrial, i una reducció de l'esteatosi i de l'estrès oxidatiu. No es pot descartar que aquestes accions de la Rsg al fetge es produeixin, almenys en part, per l'activació de la via de l'adiponectina.

En conjunt, els resultats d'aquesta tesi doctoral mostren un ampli ventall d'efectes hepatoprotectors de l'E2, associats significativament a la millora de la funció mitocondrial. Aquests efectes de l'hormona són especialment rellevants en un context de lipotoxicitat, ja que eviten la progressió de la disfunció hepàtica. Així mateix, els resultats contribueixen al coneixement de mecanismes moleculars implicats en la diferent prevalença entre sexes de patologies hepàtiques caracteritzades per l'acumulació excessiva de lípids al fetge, i es recolza el manteniment de l'homeòstasi mitocondrial com estratègia terapèutica per tractar aquests desordres.



Los estrógenos como moduladores de la función y la biogénesis mitocondriales del hígado. Relación con la esteatosis hepática y la resistencia a la insulina

Universitat
de les Illes Balears

Tesis doctoral, Isabel Maria Galmés Pascual, 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 evidenciado la existencia de un dimorfismo sexual en la función y la biogénesis mitocondriales en el hígado de rata, de manera que las hembras presentan mitocondrias más diferenciadas, con mayor capacidad oxidativa y antioxidante. Teniendo en cuenta estos antecedentes, el objetivo de esta tesis doctoral ha sido el estudio del papel de los estrógenos en la modulación de la función y la biogénesis mitocondriales en el hígado, poniendo énfasis en su implicación en la mejora de la esteatosis y de la resistencia a la insulina hepáticas en una situación de lipotoxicidad. Para alcanzar este objetivo se han utilizado dos modelos *in vivo* con ratas Wistar: ovariectomizadas y suplementadas con 17β -estradiol (E2), y de ambos sexos alimentadas con una dieta hiperlipídica (HFD) y tratadas con rosiglitazona (Rsg). Estos estudios se han complementado con experimentos *in vitro* con hepatocitos HepG2.

La ovariectomía empeora la función y la biogénesis mitocondriales, incrementa el estrés oxidativo y modifica el metabolismo lipídico en el hígado, alteraciones que son restablecidas, algunas parcialmente, por el tratamiento de los animales con E2. Los experimentos en hepatocitos HepG2 demuestran que la estimulación de la función mitocondrial por parte del E2 tiene lugar principalmente a través del coactivador transcripcional PGC- 1β , siendo más susceptible al entorno hormonal que PGC- 1α . Así, se confirma la contribución del E2 al dimorfismo sexual en la función y la biogénesis mitocondriales en el hígado, de acuerdo con la menor incidencia de desórdenes subyacentes a la disfunción mitocondrial que presenta el sexo femenino. La relevancia de PGC- 1β como mediador de

los efectos del E2 lo convierte en una diana terapéutica potencial frente a los desórdenes mitocondriales hepáticos.

Las ratas hembra, en comparación a las macho, son más resistentes a los efectos perjudiciales de una HFD; presentan un mejor perfil lipídico circulante y un menor grado de esteatosis hepática. En respuesta a la elevada disponibilidad de combustibles lipídicos, tanto en el hígado de las hembras como en las células HepG2, se da una regulación de la expresión de genes implicados en el metabolismo lipídico, que conduce a la disminución de la acumulación intracelular de lípidos. En estas circunstancias, la activación de la AMPK hepática sería un mecanismo clave en la regulación del metabolismo lipídico por parte del E2. Además, los efectos del E2 estimulando la función y la biogénesis mitocondriales también ocurren en el hepatocito en condiciones de lipotoxicidad, y se asocian con la mejora de la sensibilidad a la insulina. De esta manera, la reducción de la producción de ROS subyacente a la mejora de la función mitocondrial, provocaría una menor activación de vías inflamatorias como la de JNK, contribuyendo a la mayor sensibilidad hepática a la insulina observada en las hembras. Por su parte, las ratas macho son más sensibles al tratamiento con Rsg, probablemente como consecuencia del mayor grado de disfunción metabólica en el hígado inducido por la HFD. De hecho, el tratamiento con el fármaco supone una mejora de la sensibilidad a la insulina y de la función mitocondrial, y una reducción de la esteatosis y del estrés oxidativo. No se descarta que estas acciones de la Rsg en el hígado se produzcan, al menos en parte, por la activación de la vía de la adiponectina.

En conjunto, los resultados de esta tesis doctoral muestran un amplio abanico de efectos hepatoprotectores del E2, asociados significativamente a la mejora de la función mitocondrial. Estos efectos de la hormona son especialmente relevantes en un contexto de lipotoxicidad, ya que evitan la progresión de la disfunción hepática. Asimismo, los resultados contribuyen al conocimiento de mecanismos moleculares implicados en la diferente prevalencia entre sexos de patologías hepáticas caracterizadas por la acumulación excesiva de lípidos en el hígado, y se refuerza el mantenimiento de la homeostasis mitocondrial como estrategia terapéutica para tratar estos desórdenes.



Universitat
de les Illes Balears

Estrogens as modulators of mitochondrial function and biogenesis in liver. Relation with hepatic steatosis and insulin resistance

Doctoral thesis, Isabel Maria Galmés Pascual, Energy Metabolism and Nutrition Group, Department of Fundamental Biology and Health Sciences

ABSTRACT

Previous studies performed in our research group revealed the existence of sexual dimorphism in mitochondrial function and biogenesis in rat liver; such that females exhibit more differentiated mitochondria, with greater oxidative and antioxidant capacities. In the light of this background, the aim of this doctoral thesis was to study the role of estrogens in mitochondrial function and biogenesis modulation in liver, and particularly their contribution to the improvement of steatosis and insulin resistance in liver in a lipotoxic environment. To achieve these purposes, two *in vivo* Wistar rat models were used: ovariectomized and supplemented with 17 β -estradiol (E2); and both sexes fed a high-fat diet (HFD) and treated with rosiglitazone (Rsg). These studies were complemented by *in vitro* experiments in HepG2 hepatocytes.

Ovariectomy impairs mitochondrial function and biogenesis, increases oxidative stress, and modifies lipid metabolism in liver, but these alterations are counteracted, some partially, by E2 treatment. Experiments in HepG2 hepatocytes show that the stimulation of mitochondrial function by E2 takes place mainly within transcriptional coactivator PGC-1 β , which is more likely to respond to the hormonal milieu than PGC-1 α . Therefore, the contribution of E2 to sexual dimorphism in mitochondrial function and biogenesis in liver is confirmed, in accordance with a lower incidence of disorders related to mitochondrial dysfunction in the female sex. The importance of PGC-1 β as a mediator of E2 effects makes it a potential therapeutic target to treat hepatic mitochondrial disorders.

Female rats, in comparison with male rats, are more resistant to the harmful effects of HFD feeding, as this sex shows a better serum lipid profile and lower hepatic steatosis. In response to increased lipid fuel

availability, in both the liver of females and HepG2 cells, a regulation in the expression of genes involved in the lipid metabolism is found, which leads to a decrease in intracellular lipid accumulation. Under such circumstances, hepatic AMPK activation may be a key mechanism in lipid metabolism regulation by E2. Moreover, E2 effects potentiating mitochondrial function and biogenesis also take place in a lipotoxic situation, and are associated with improved insulin sensitivity. In this way, decreased ROS production induced by improved mitochondrial function may reduce activation of inflammatory pathways such as JNK, leading to the enhanced insulin hepatic sensitivity reported in female rats. On the other hand, male rats are more sensitive to Rsg treatment, probably as a consequence of the greater degree of metabolic dysfunction induced in liver by the HFD. In fact, drug treatment leads to an improvement in both insulin sensitivity and mitochondrial function, and a reduction in both steatosis and oxidative stress. The effects of Rsg in liver, at least in part, through activation of the adiponectin pathway, cannot be ruled out.

On the whole, the results of this doctoral thesis reveal a widespread protective role of E2 in hepatocytes, which is significantly associated to improved mitochondrial function. These hormonal effects are particularly relevant in a lipotoxic context to avoid progression of hepatic dysfunction. Furthermore, the results contribute to understanding the molecular mechanisms involved in the different prevalence of hepatic pathologies between sexes, characterized by excessive lipid accumulation in liver; and support the maintenance of mitochondrial homeostasis as a therapeutic strategy to treat these disorders.

PUBLICACIONS DERIVADES DE LA TESI DOCTORAL

Una part dels resultats d'aquesta tesi doctoral s'ha recopilat en la següent publicació que es presenta a l'annex 1:

- Galmés-Pascual BM, Nadal-Casellas A, Bauza-Thorbrügge M, Sbert-Roig M, García-Palmer FJ, Proenza AM, Gianotti M, Lladó I. *17 β -estradiol improves hepatic mitochondrial biogenesis and function through PGC1B*. Journal of Endocrinology, 2017, 232 (2): 297-308. DOI: 10.1530/JOE-16-0350

A més, durant la realització de la tesi, la doctoranda ha col·laborat en altres estudis en el context de la línia de recerca general del grup d'investigació, els resultats dels quals s'han inclòs en tres articles que es presenten a l'annex 2:

- Bauzá-Thorbrügge M, Galmés-Pascual BM, Sbert-Roig M, García-Palmer FJ, Gianotti M, Proenza AM, Lladó I. *Antioxidant peroxiredoxin 3 expression is regulated by 17beta-estradiol in rat white adipose tissue*. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, en curs de publicació. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2017.05.008
- 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
- 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 hepàtic

El fetge és un òrgan clau en la regulació del metabolisme energètic global, atès que s'hi dona el processament de carbohidrats, lípids i proteïnes. Realitza les seves accions des d'una posició estratègica, ja que constitueix un pont entre el sistema portal, col·lector del drenat intestinal i hormonal pancreàtic, i la vena cava inferior. En col·laboració i integració amb altres teixits com el múscul i el teixit adipós s'encarrega de mantenir l'homeòstasi calòrica, assegurant un subministrament adequat de nutrients als teixits en funció de les seves necessitats i de l'estat nutricional de l'organisme. Les oscil·lacions de la glucèmia han de ser mínimes, ja que la glucosa és la principal font d'energia utilitzada pel cervell, la medul·la suprarenal i els eritròcits. Per això, el fetge s'encarrega de regular la glucèmia després d'una ingesta i de mantenir-la constant durant una fase postabsortiva o de dejú, per l'acció conjunta de nutrients, d'hormones i del sistema nerviós vegetatiu. Després d'una ingesta, el fetge produeix glucogen i greixos a partir dels metabòlits aportats. El glucogen s'emmagatzema i els greixos són alliberats a la sang en forma de lipoproteïnes de molt baixa densitat (VLDL). Durant el dejú, el fetge produeix i allibera glucosa per a subministrar-la a altres teixits, funció que compleix a través de la mobilització de les reserves de glucogen i de la gluconeogènesi o formació *de novo* de glucosa. A més a més, els àcids grassos poden ser convertits al fetge en cossos cetònics per a proveir energia addicional als altres teixits (Koolman & Röhm 2004; Tresguerres 2005).

Donada la rellevància del fetge en l'homeòstasi energètica de l'organisme, no és sorprenent que la disfunció de l'hepatòcit estigui relacionada amb desequilibris del metabolisme sistèmic. L'obesitat i la síndrome metabòlica estan associades a alteracions metabòliques al fetge, que poden conduir o predisposar a la malaltia del fetge gras no alcohòlic (NAFLD, de l'anglès *nonalcoholic fatty liver disease*). El terme NAFLD engloba un ampli espectre de desordres caracteritzats per l'acumulació de greix al fetge, condició que pot progressar cap a estats

més lesius i fins i tot a carcinoma hepatocel·lular (Buzzetti *et al.* 2016). Els patrons alimentaris no saludables, amb presència desequilibrada de nutrients, són factors de risc per a l'obesitat, la síndrome metabòlica i la NAFLD. Concretament, aquestes patologies estan associades amb el consum de dietes hipercalòriques, especialment riques en àcids grassos saturats (SFA, de l'anglès *saturated fatty acid*), àcids grassos trans i colesterol, i de begudes endolcides amb fructosa i sacarosa. En canvi, la reducció de la ingesta calòrica, l'increment del consum de proteïna de soja i de sèrum lacteri, així com la suplementació amb àcids grassos monoinsaturats, omega-3 i probiòtics tindrien efectes preventius i terapèutics (Fan & Cao 2013). La resistència a la insulina juga un paper destacat en la patologia de l'esteatosi i en l'increment de la gluconeogènesi hepàtica, tot i que altres esdeveniments intervenen en aquests desajustos metabòlics, com l'estrès oxidatiu, la disfunció mitocondrial, l'estrès del reticle endoplasmàtic, citocines i adipocines proinflamatòries o la modificació de la microbiota intestinal (Gruben *et al.* 2014; Vacca *et al.* 2015).

A més del manteniment de l'homeòstasi calòrica, el fetge té més funcions destacades que el situen com a òrgan clau i central dins l'organisme, com la participació en els processos de destoxicació, en la síntesi de colesterol, d'àcids biliars i d'elements de coagulació, i en l'emmagatzemament de ferritina i de vitamines, entre d'altres.

1.1.1. Metabolisme glucídic

La glucosa circulant deriva dels aliments ingerits, de la gluconeogènesi i de la mobilització del glucogen (glucogenòlisi). El fetge és el principal òrgan responsable de la gluconeogènesi i la glucogenòlisi, permetent l'alliberament de glucosa a la sang i, per tant, la seva captació per part d'altres teixits (Rines *et al.* 2016).

En una situació d'abundància energètica, la glucosa de la sang és captada pels hepatòcits a través del transportador de glucosa GLUT2, situat a la membrana plasmàtica i que presenta baixa afinitat per a la glucosa, permetent així que sigui captada per altres teixits abans d'arribar al fetge. Un cop la glucosa ha entrat dins l'hepatòcit, és fosforilada a glucosa-6-fosfat (G6P) a través de la glucocinasa hepàtica (L-GCK), assegurant així la seva retenció dins la cèl·lula (Bechmann *et al.* 2012). L'abundància de glucosa i l'acció de la insulina actuen de manera sinèrgica en la translocació al citoplasma i activació de la L-GCK (Bechmann *et al.* 2012). La G6P és utilitzada, llavors, com a precursor per a la síntesi de glucogen a través de la glucogenogènesi, però també es pot convertir en piruvat a través de la glucòlisi. Al fetge, la unió de la insulina al seu receptor promou la glucogenogènesi a la vegada que suprimeix la glucogenòlisi. L'activitat de la glucogen sintasa (GS) s'inhibeix per fosforilació, principalment per acció de la glucogen sintasa cinasa 3 (GSK3). La insulina activa la proteïna cinasa B (Akt), que fosforila la GSK3, inhibint-la i promovent així la glucogenogènesi (Bechmann *et al.* 2012). A més, la insulina també promou la fosforilació de la glucogen fosforilasa, suprimint la glucogenòlisi. Altrament, la insulina estimula la conversió de la G6P a piruvat a través de la glucòlisi. El piruvat pot ser completament oxidat al mitocondri per generar ATP o bé pot ser utilitzat per sintetitzar àcids grassos a través de la lipogènesi *de novo*. Finalment, a través de la via de les pentoses fosfat, la G6P pot també generar NADPH, requerit per a la síntesi d'àcids grassos al fetge.

Durant el dejú a curt termini, el fetge s'encarrega de proporcionar la glucosa necessària pel funcionament dels altres òrgans a través de la mobilització de les reserves de glucogen, i durant un dejú més prolongat, a través de la gluconeogènesi (Rui 2014). La hidròlisi del glucogen per generar glucosa és catalitzada per la glucogen fosforilasa en un procés afavorit pel glucagó. La gluconeogènesi, es dona a partir de metabòlits generats al fetge o arribats a través de la circulació, com lactat, glicerol i aminoàcids. Es troba regulada principalment pels enzims piruvat carboxilasa, fosfoenolpiruvat carboxinasa (PEPCK), fructosa-1,6-bisfosfatasa i glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa). L'acció de la insulina reprimeix l'expressió dels gens gluconeogènics a través de la inhibició de la proteïna de domini forkhead O1 (FoxO1) per part d'Akt (Bechmann *et al.* 2012). Altres factors de transcripció també regulen la gluconeogènesi, tals com la proteïna d'unió a l'element de resposta a cAMP (CREB), els factors nuclears hepàtics (HNFs), o el coactivador 1 α del receptor activat per proliferadors peroxisomals γ (PGC-1 α), entre d'altres (Jitrapakdee 2012).

1.1.2. Metabolisme lipídic

Els àcids grassos no esterificats (NEFAs, de l'anglès *non-esterified fatty acid*) presents al fetge poden provenir de diferents fonts: captats de la circulació després de ser alliberats pel teixit adipós blanc (WAT, de l'anglès *white adipose tissue*) com a resultat de la lipòlisi dels triglicèrids (TG), generats a partir de la hidròlisi dels quilomicrons provinents de l'intestí, o bé sintetitzats a través de la lipogènesi *de novo* (fig. 1) (Begrache *et al.* 2013).

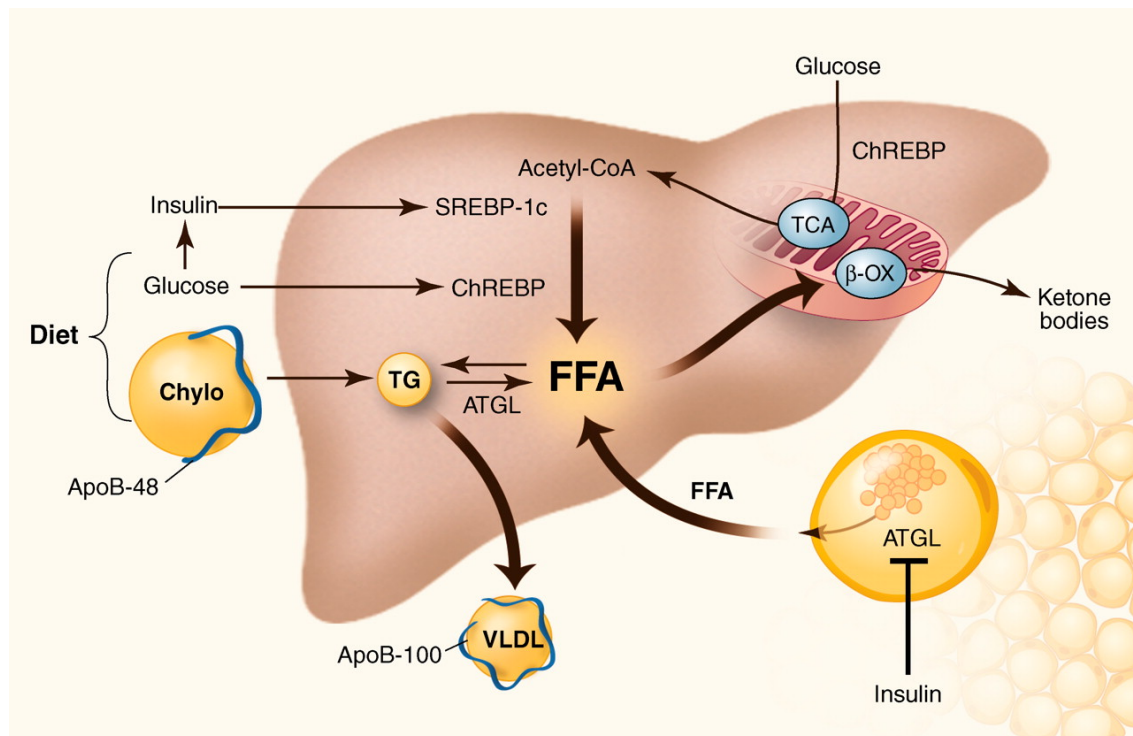


Figura 1. Metabolisme lipídic hepàtic. FFA, àcids grassos no esterificats; TG, triglicèrids; chylo, quilomicro; ChREBP, element de resposta als carbohidrats; SREBP-1c, proteïna 1c d'unió a elements reguladors d'esterols; VLDL, lipoproteïnes de molt baixa densitat; ApoB-100, apolipoproteïna B-100; TCA, cicle de Krebs; ATGL, lipasa de TG del teixit adipós. (Extret de Cohen *et al.* 2011).

S'han descrit nombroses proteïnes que faciliten el transport dels NEFAs plasmàtics a l'hepatòcit, com la translocasa d'àcids grassos (CD36/FAT), la proteïna d'unió a àcids grassos (FABP), la proteïna transportadora d'àcids grassos (FATP) o les caveolines (Nassir & Ibdah 2014).

Un cop al fetge, i depenent de la situació fisiològica, els NEFAs poden entrar al mitocondri per oxidar-se, o bé poden esterificar-se a TG. L'entrada dels NEFAs de cadena llarga al mitocondri és un procés dependent de la transferasa 1A de palmitoilcarnitina (CPT1A), present a la membrana externa mitocondrial. Els TG poden acumular-se al citoplasma dels hepatòcits en forma de gotes lipídiques o bé secretar-se com a VLDL (Begriche *et al.* 2013).

Després d'un àpat, els nivells elevats de glucosa i d'insulina promouen la síntesi de NEFAs i TG a l'hepatòcit. A banda dels NEFAs arribats al fetge a través dels quilomicros circulants, aquestes molècules poden ser obtingudes a partir del piruvat generat a la glucòlisi a través de la

lipogènesi *de novo*. L'acetil-CoA forma malonil-CoA i NEFAs per acció de l'acetil-CoA carboxilasa (ACC) i l'àcid gras sintasa (FAS). Altrament, els alts nivells de malonil-CoA inhibeixen la CPT1A, disminuint així la β -oxidació. En conseqüència, els NEFAs són dirigits cap a la formació de TG, que poden ser emmagatzemats en gotes lipídiques o bé ser secretats a la circulació com a VLDL. Aquestes accions són també dirigides per l'acció sinèrgica dels factors de transcripció proteïna 1c d'unió a elements reguladors d'esterols (SREBP-1c) i element de resposta als carbohidrats (ChREBP), que incrementen l'expressió de gens lipogènics tals com l'ACC i la FAS, entre d'altres. Aquests factors, a més, incrementen l'expressió d'enzims claus de la glucòlisi, com la glucocinasa i la L-piruvat cinasa (Han *et al.* 2016), afavorint d'aquesta manera l'obtenció d'acetil-CoA per incrementar la disponibilitat de precursors lipogènics.

En canvi, durant el dejú, els nivells baixos d'insulina i els elevats nivells de glucagó afavoreixen la hidròlisi dels TG del teixit adipós i l'alliberament dels NEFAs resultants a la circulació. Dins els mitocondris dels hepatòcits, aquests NEFAs, a través de la β -oxidació, es converteixen en acetil-CoA, que pot ser completament oxidat al cicle de Krebs, o bé donar lloc a cossos cetònics, que seran secretats per proporcionar energia a altres teixits. A més, en aquesta situació, els nivells de malonil-CoA són baixos, la qual cosa afavoreix la importació dels NEFAs de cadena llarga al mitocondri i la seva oxidació (Begrache *et al.* 2013). Aquests efectes són estimulats pel receptor activat per proliferadors peroxisomals α (PPAR α), el qual incrementa l'expressió de nombrosos enzims involucrats en la β -oxidació, com la CPT1A, la deshidrogenasa d'acils-CoA de cadena mitjana (MCAD) o l'acil-CoA oxidasa 1 (ACOX); i en la cetogènesi, com la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) sintasa, entre d'altres (Begrache *et al.* 2006; Pawlak *et al.* 2015).

1.2. El mitocondri

Els mitocondris són orgànuls de doble membrana encarregats de dirigir el metabolisme energètic de la cèl·lula eucariota. La seva principal funció és la de proporcionar energia en forma d'ATP a través de la fosforilació oxidativa. Aquest procés té lloc gràcies a l'oxidació prèvia dels nutrients durant la β -oxidació i el cicle de Krebs, processos que generen el poder reductor necessari per a l'obtenció d'energia a la cadena de transport electrònic. Els mitocondris també són la principal font de generació d'espècies reactives d'oxigen (ROS), molècules molt reactives que poden provocar dany oxidatiu al DNA, proteïnes i lípids. La proliferació cel·lular, l'apoptosi, l'homeòstasi del calci o la biosíntesi de grups hemo, purines i esteroides, són altres funcions que presenten els mitocondris (Murphy 2009; Bhatti *et al.* 2016).

1.2.1. El genoma mitocondrial

Els mitocondris contenen el seu propi genoma, el DNA mitocondrial (mtDNA), el qual disposa d'un codi genètic modificat de l'universal. Cada mitocondri conté de 800 a 1000 còpies de mtDNA, transmèses per herència materna i empaquetades en estructures ordenades anomenades nucleoides (Friedman & Nunnari 2014). El mtDNA presenta una taxa de mutació més elevada que la del DNA nuclear pel fet de trobar-se poc protegit per proteïnes, per situar-se físicament associat a la membrana interna mitocondrial (on es produeixen principalment les ROS), i per posseir uns mecanismes de reparació menys eficaços que els del genoma nuclear (Kim *et al.* 2015).

El mtDNA conté trenta-set gens que codifiquen per dos RNA ribosòmics (12S i 16S), vint-i-dos RNA de transferència i tretze polipèptids, que formen part dels complexos respiratoris. Set d'aquests polipèptids, ND1-6 i ND4L, són subunitats del complex I (NADH:ubiquinona oxidoreductasa); un, el citocrom *b*, forma part del complex III (ubiquinona:citocrom *c* oxidoreductasa); tres, COX I-III, són subunitats

del complex IV (citocrom *c* oxidasa); i dos, subunitats 6 i 8, formen part de l'ATP sintasa (Alexeyev *et al.* 2013). Les demás proteïnes dels complexos respiratoris i la resta de proteïnes mitocondrials es troben codificades al genoma nuclear, per la qual cosa han de ser importades al mitocondri mitjançant diferents mecanismes (Becker *et al.* 2012). Per tant, resulta essencial la regulació coordinada de l'expressió dels genomes nuclear i mitocondrial per al manteniment del funcionament dels mitocondris i per a la seva resposta a diferents estímuls.

1.2.2. Biogènesi mitocondrial

El correcte funcionament i integritat estructural dels mitocondris és indispensable pel manteniment bioenergètic cel·lular, fet que s'assoleix mitjançant el control de la biogènesi mitocondrial. Aquest procés engloba tant la proliferació, o augment del nombre de mitocondris, com la diferenciació, o augment de les capacitats funcionals dels mitocondris preexistents (Fernández-Silva *et al.* 2003). La biogènesi mitocondrial és un procés complex que implica l'expressió coordinada de més de 1000 gens codificats tant al genoma mitocondrial com al nuclear. L'expressió d'aquests gens s'adapta a la demanada energètica i a canvis fisiològics (Jornayvaz & Shulman 2010). Per exemple, la biogènesi mitocondrial augmenta en el múscul en resposta a l'exercici o al teixit adipós marró durant la termogènesi adaptativa (Cannon & Nedergaard 2004).

Cal destacar que els mitocondris no són orgànuls estàtics, sinó que canvien contínuament de morfologia i de localització per mantenir un correcte funcionament tant en condicions normals com en resposta a l'estrès. Aquestes accions dinàmiques inclouen tant processos de fissió com de fusió mitocondrials (Babbar & Sheikh 2013; van der Bliek *et al.* 2013). La fusió atenua l'estrès mitjançant la unió i cooperació de mitocondris parcialment danyats, mentre que el procés de fissió contribueix a l'eliminació dels mitocondris danyats a través de la mitofàgia (Babbar & Sheikh 2013).

1.2.3. Factors reguladors de la funció i la biogènesi mitocondrials

Existeixen varis elements que actuen com a coordinadors dels genomes nuclear i mitocondrial, amb el fi de regular la biogènesi i l'activitat dels mitocondris en funció de la demanda energètica (Scarpulla *et al.* 2012) (fig. 2).

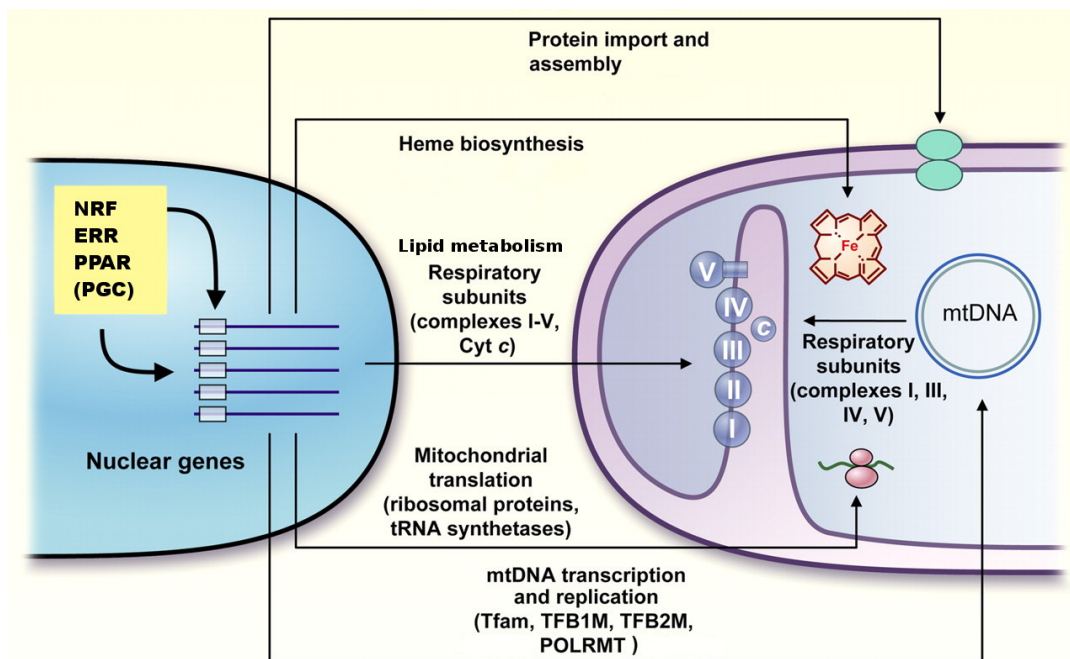


Figura 2. Representació resumida de la coordinació entre els genomes nuclear i mitocondrial, necessària pel correcte manteniment i funcionament dels mitocondris. NRF, factor nuclear de respiració; ERR, receptor relacionat amb estrògens; PPAR, receptor activat per proliferadors peroxisomals; PGC, coactivador del receptor activat per proliferadors peroxisomals; mtDNA, DNA mitocondrial; TFAM, factor de transcripció mitocondrial A; TFB1M i TFB2M, factors transcripcionals mitocondrials B1 i B2; POLRMT, RNA polimerasa mitocondrial. (Modificat de Scarpulla 2008).

Factor de transcripció mitocondrial A

El factor de transcripció mitocondrial A (TFAM), codificat al genoma nuclear, pertany a la família de les proteïnes d'elevada mobilitat, i s'encarrega d'estimular la transcripció del mtDNA de manera bidireccional. S'uneix de manera específica a regions situades corrent amunt dels promotors d'ambdues cadenes, des d'on permet el reclutament de la RNA polimerasa i del factor transcripcional

mitocondrial B2 (TFB2M), permetent l'inici i estabilització de la transcripció (Ramachandran *et al.* 2017). A més, el TFAM té un paper en la regulació de la replicació del mtDNA, ja que la transcripció de la cadena lleugera produeix els encebadors necessaris per a la iniciació de la replicació del mtDNA (Pham *et al.* 2006). Finalment, cal dir que el TFAM també s'uneix de manera inespecífica al genoma mitocondrial, permetent el seu empaquetatge i la seva estabilització (Shi *et al.* 2012).

Factors nuclears de respiració

Els factors nuclears de respiració 1 i 2 (NRF-1 i NRF-2) van ser els primers factors de transcripció nuclears descrits com a implicats en l'expressió de proteïnes mitocondrials.

NRF-1 activa l'expressió de gens que codifiquen per components del sistema de fosforilació oxidativa, transportadors mitocondrials i proteïnes ribosomals mitocondrials. A més, regula l'expressió del TFAM, TFB1M i TFB2M (Scarpulla *et al.* 2012). NRF-2 realitza un paper directe en el control de l'expressió de les subunitats del complex IV de la cadena de transport electrònic, de proteïnes implicades en el transport de la maquinària mitocondrial i de factors inicials de la traducció mitocondrial, així com també de TFAM, TFB1M i TFB2M (Scarpulla *et al.* 2012).

Receptors activats per proliferadors peroxisomals

Els PPARs són factors de transcripció activats per lligands que pertanyen a la superfamília dels receptors nuclears i que juguen un paper important en l'homeòstasi lipídica. Són activats de manera endògena principalment pels àcids grassos i els seus derivats. Es coneixen tres subtipus de PPARs; PPAR α , PPAR δ (també anomenat PPAR β) i PPAR γ , els quals comparteixen el mateix mode d'acció molecular via formació d'heterodímers amb el receptor X de retinoides (RXR) i posterior unió als

elements de resposta als proliferadors peroxisomals (PPREs) (Rakhshandehroo *et al.* 2010).

El primer PPAR identificat fou PPAR α , el qual s'expressa predominantment a teixits que presenten un elevat rati de catabolisme mitocondrial i peroxisomal d'àcids grassos, com el fetge, el teixit adipós marró, el cor i el múscul esquelètic. Al fetge, a més de ser el principal regulador del metabolisme lipídic hepàtic, també és capaç de controlar el metabolisme glucídic i el lipoproteic, així com la inflamació i proliferació hepàtiques (Rakhshandehroo *et al.* 2010). Una de les seves funcions fisiològiques més importants és la de promoure la utilització d'àcids grassos durant el dejú per permetre així la gluconeogènesi i la cetogènesi, proporcionant l'energia necessària pel funcionament dels teixits perifèrics (Geisler *et al.* 2016). Entre d'altres, PPAR α regula positivament l'expressió de proteïnes involucrades en la captació d'àcids grassos, en la β -oxidació mitocondrial i peroxisomal i en la secreció de les VLDL, aquest darrer procés a través del control de la proteïna de transferència de triglicèrids microsomal (MTP). A més, PPAR α estimula l'expressió de les proteïnes desacoblants (UCPs) (Rakhshandehroo *et al.* 2010; Yoon 2010; Vacca *et al.* 2015). En models animals de NAFLD, l'activació de PPAR α a través de lligands sintètics com els fenofibrats o els compostos WY-14643 i GW-7647, redueix l'esteatosi, la inflamació i la fibrosi al fetge (Pawlak *et al.* 2015). Per contra, els ratolins deficients en PPAR α i exposats a una dieta hiperlipídica són més susceptibles a l'esteatosi hepàtica i a la progressió de la NAFLD, degut a un empitjorament de la β -oxidació i a un increment de l'estrès oxidatiu i de la inflamació (Stienstra *et al.* 2007; Abdelmegeed *et al.* 2011).

PPAR δ s'expressa de manera ubiqüa, tot i que és particularment abundant al múscul esquelètic i al cor, on a part de promoure el metabolisme lipídic, també estimula el metabolisme glucídic i intervé en la formació de fibres musculars oxidatives. La funció de PPAR δ al fetge està poc esclarida. Mentre alguns estudis apunten a què PPAR δ controla

l'oxidació dels àcids grassos i el desacoblament de la fosforilació oxidativa (Vacca *et al.* 2015), altres suggereixen que la seva funció està lligada al control de la lipogènesi i la utilització de la glucosa (Fan & Evans 2015).

PPAR γ és considerat el principal regulador dels gens involucrats en les vies lipogèniques. S'expressa de manera abundant al teixit adipós, on augmenta la sensibilitat a la insulina i promou la captació d'àcids grassos i la diferenciació de l'adipòcit, amb el consegüent increment del contingut intracel·lular de TG i la reducció de l'alliberament d'àcids grassos a la circulació, que altrament podrien ser captats pel fetge (Tontonoz & Spiegelman 2008; Videla & Pettinelli 2012). En comparació amb el teixit adipós, el fetge expressa baixos nivells de PPAR γ , tot i que en diverses condicions patològiques aquests nivells poden augmentar i tenir un impacte significatiu en l'homeòstasi metabòlica i la funció de l'òrgan. De fet, al fetge, l'activació de PPAR γ contribueix al desenvolupament de l'esteatosi a través de mecanismes que condueixen a l'activació de gens lipogènics (Videla & Pettinelli 2012).

Coactivadors del receptor activat per proliferadors peroxisomals γ

La família dels PGCs inclou PGC-1 α , PGC-1 β i el coactivador tipus PGC-1 α (PRC). Els tres membres presenten similituds de seqüència, comparteixen el mode d'acció i són capaços de regular la biogènesi mitocondrial en diversos teixits (Villena 2015). A diferència d'altres coactivadors, els membres de la família dels PGCs no presenten activitat histona acil transferasa que els permeti remodelar la cromatina i controlar directament la transcripció gènica. Els PGCs actuen com a plataformes d'unió amb altres proteïnes que sí posseeixen activitat acil transferasa i afavoreixen l'assemblatge de la maquinària de transcripció. A més, l'activitat dels PGCs pot ser modulada a través de modificacions posttraduccionals, tals com la fosforilació induïda per la cinasa activada per AMP (AMPK), o la desacetilació induïda per la sirtuïna 1 (Villena

2015). Tot i que presenten moltes similituds, els tres coactivadors mostren diferències quant al context fisiològic on actuen (Villena 2015).

El primer membre descrit fou PGC-1 α , el qual s'identificà com a coactivador transcripcional de PPAR γ en adipòcits marrons durant la termogènesi adaptativa en resposta al fred (Liu & Lin 2011). PGC-1 α és capaç de controlar un ample ventall d'aspectes relacionats amb la biogènesi mitocondrial i el metabolisme, ja que interacciona i coactiva directament els PPAR α , els NRFs, i els receptors relacionats amb estrògens (fig. 3) (Scarpulla *et al.* 2012).

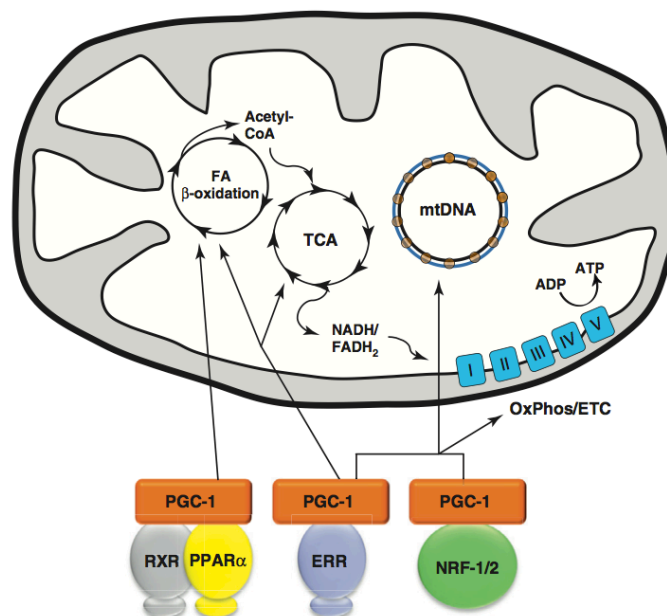


Figura 3. Control de la biogènesi mitocondrial per PGC-1 al fetge. PGC-1, coactivador del receptor activat per proliferadors peroxisomals γ ; PPAR, receptor activat per proliferadors peroxisomals; RXR, receptor de retinoid X; ERR, receptor relacionat amb estrògens; NRF, factor nuclear de respiració; mtDNA, DNA mitocondrial; TCA, cicle de Krebs. (Extret de Scarpulla *et al.* 2012).

En resposta al dejú, l'expressió hepàtica de PGC-1 α augmenta, essent llavors capaç d'interaccionar amb FoxO1, HNF4 α o receptors de glucocorticoides. Conseqüentment, PGC-1 α activa la transcripció de gens gluconeogènics, com PEPCK o G6Pasa, promovent la producció hepàtica de glucosa i el manteniment de l'homeòstasi glucídica (Puigserver & Spiegelman 2003; Wang *et al.* 2014). En ratolins diabètics i

resistents a l'acció de la insulina, s'indueix PGC-1 α , indicant que la seva activació al fetge podria promoure diabetis i obesitat. Per tant, i a diferència d'altres teixits com el múscul esquelètic, al fetge, l'activació de PGC-1 α no constituiria un bon model de diana terapèutica contra els desordres associats a la diabetis (Puigserver & Spiegelman 2003; Besseiche *et al.* 2015).

PGC-1 β , degut a les similituds de seqüència amb PGC-1 α , també és capaç d'unir-se i activar els mateixos factors de transcripció relacionats amb la funció i la biogènesi mitocondrials (fig. 3). No obstant, PGC-1 β no s'indueix en el teixit adipós marró en resposta al fred (Liu & Lin 2011; Vacca *et al.* 2015), és un inductor pobre de la gluconeogènesi hepàtica (Lin *et al.* 2003) i, a diferència de PGC-1 α , regula varis aspectes del metabolisme lipídic. PGC-1 β s'indueix en resposta als àcids grassos de la dieta, la qual cosa condueix a un augment de la lipogènesi. Aquests efectes són exercits principalment a través de la seva interacció amb SREBP-1c (Lin *et al.* 2005). No obstant, la regulació del metabolisme lipídic que realitza PGC-1 β no es restringeix només a la síntesi de lípids, sinó que també regula la síntesi i secreció de les VLDL (Wolfrum & Stoffel 2006). Malgrat l'estimulació de la lipogènesi, l'activació selectiva de PGC-1 β als hepatòcits protegeix de l'esteatosi, degut a la seva acció combinada sobre la síntesi de lípids, la fosforilació oxidativa, la β -oxidació, el cicle de Krebs i la secreció de lípids (Bellafante *et al.* 2013). De fet, ratolins amb deleció de PGC-1 β exhibeixen esteatosi hepàtica, degut en part a l'empitjorament de la capacitat funcional dels mitocondris (Chambers *et al.* 2012).

Cal destacar que s'han descrit mecanismes compensatoris entre PGC-1 α i PGC-1 β . Així, la supressió de PGC-1 β a ratolins suposa una disfunció de varis òrgans, entre ells el fetge, però sembla contrarestada en part per una regulació a l'alça de PGC-1 α al teixit adipós (Lelliott *et al.* 2006). Per tant, no es poden descartar altres mecanismes compensatoris entre ambdós PGCs degut a la redundància de les seves funcions (Villena 2015).

El tercer membre de la família, PRC, descobert més recentment, és induït a les cèl·lules quiescents per estimulació sèrica i inhibit per la retirada del sèrum o el contacte cel·lular. S'uneix als factors de transcripció NRF-1, CREB i el receptor relacionat amb estrògens α , regulant també aspectes relacionats amb la funció mitocondrial (Scarpulla 2011).

1.2.4. Cadena de transport electrònic i producció de ROS

La cadena de transport electrònic està composta per quatre complexos proteics (complex I-IV) associats a la membrana mitocondrial interna (fig. 4). Els electrons cedits pels coenzims NADH i FADH₂ són transferits des del complex I o II cap al III, i llavors al IV, on es combinen amb oxigen, el darrer acceptor d'electrons, i el redueixen a aigua. El flux seqüencial d'electrons a través de la cadena de transport electrònic està associat a la generació d'un gradient protònic a l'espai intermembrana, el qual és utilitzat per l'ATP sintasa (també considerat complex V) per generar ATP a partir d'ADP+Pi (Sazanov 2015). No obstant, el flux d'electrons a través de la cadena de transport electrònic és un procés imperfecte i part de l'oxigen consumit pels mitocondris és reduït de forma incompleta per electrons que s'escapen de la cadena de transport electrònic, generant d'aquesta manera ROS, tals com l'anió superòxid (O₂^{•-}), el radical hidroxil (•OH) o el peròxid d'hidrogen (H₂O₂) (fig. 4).

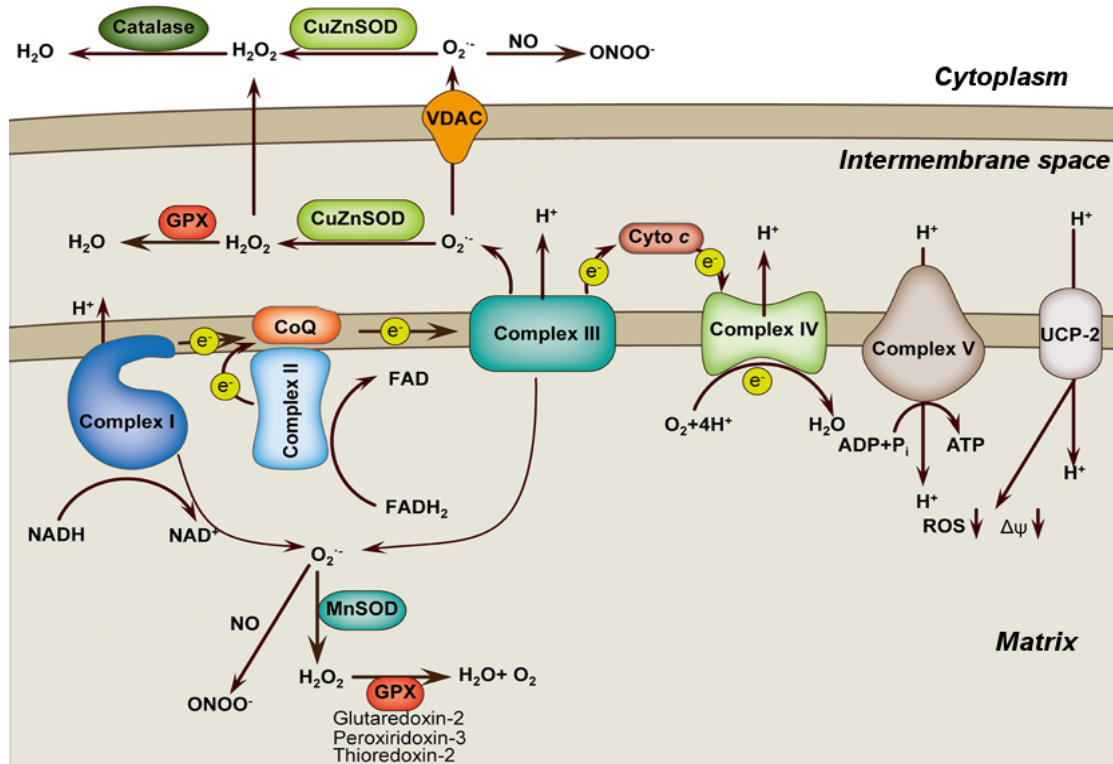


Figura 4. Cadena de transport electrònic i formació de ROS. CuZn-SOD, superòxid dismutasa de coure/zinc; Mn-SOD, superòxid dismutasa de manganès; $\Delta\psi$, potencial de membrana mitocondrial; NO, òxid nítric; ROS, espècies reactives d'oxigen; UCP2, proteïna desacoblant 2; VDAC, canal aniònic dependent de voltatge. (Modificat de Tang *et al.* 2014).

El $O_2^{\cdot-}$ és ràpidament convertit a H_2O_2 per dismutació espontània o per acció de les superòxids dismutases (SODs). El H_2O_2 és relativament estable i permeable a la membrana, de manera que pot difondre al citosol. A més, en presència de cations com ferro, i a través de la reacció de Fenton, el H_2O_2 pot generar $\cdot OH$. Aquesta espècie, la més reactiva de totes, es genera també per reacció del $O_2^{\cdot-}$ amb el H_2O_2 . El $O_2^{\cdot-}$ pot, a més, reaccionar amb l'òxid nítric (NO) i formar radical peroxinitrit ($\cdot ONOO^-$). A banda de la respiració mitocondrial, altres enzims citosòlics són capaços de generar ROS. Entre aquests, destaquen la NADPH oxidasa, la xantina oxidasa i les sintases d'òxid nítric (Birben *et al.* 2012).

Per neutralitzar les ROS, les cèl·lules compten amb un potent sistema antioxidant, compost per mecanismes enzimàtics i no enzimàtics (fig. 4) (Andreyev *et al.* 2015). El $O_2^{\cdot-}$ pot ser convertit a H_2O_2 per acció de la

SOD de manganès (MnSOD), situada a la matriu mitocondrial, o de la SOD de coure/zinc (CuZnSOD) situada al citosol. Addicionalment, la cèl·lula compta amb altres mecanismes enzimàtics que condueixen a la conversió del H_2O_2 a aigua, com la catalasa, les tioredoxines, les peroxiredoxines (PRXs) o les glutaredoxines. A més, el fetge participa en la protecció enfront de l'oxidació lipídica i l'aterosclerosi a través de l'expressió i secreció de la paraoxonasa 1 (PON1), disminuint d'aquesta manera el risc de patir aterosclerosi (Fuhrman 2012). Altres molècules no enzimàtiques contribueixen a la protecció de la cèl·lula enfront de l'estrès oxidatiu, com les vitamines A, C, i E, el glutatió, la bilirubina i l'àcid úric (Sedlak *et al.* 2009). Finalment, en la defensa contra les ROS, cal destacar el paper de UCPs. La principal funció de les UCPs és transportar protons des de l'espai intermembrana cap a la matriu mitocondrial, dissipant el gradient protònic originat per la cadena respiratòria, evitant la formació d'ATP (fig. 4). El fetge expressa baixos nivells d'UCP2, tot i que aquests augmenten en resposta als àcids grassos plasmàtics (Cortez-Pinto & Machado 2009). No obstant, l'UCP2 sembla no tenir un paper clau en la protecció contra la NAFLD, donat que l'increment d'aquesta proteïna desacoblant que es dona al fetge esteatòsic no sembla suficient per reduir la producció de ROS (Cortez-Pinto & Machado 2009).

Els mitocondris contínuament exposats a nivells alts de ROS sofreixen l'oxidació dels complexos de la cadena de transport electrònic, del mtDNA i dels lípids, de manera que es compromet la seva funció. Llavors, el dany d'aquestes molècules empitjora la funció de la cadena de transport electrònic, donant lloc a la formació de més ROS, en un cercle que esdevé viciós (Guo *et al.* 2013a). L'estrès oxidatiu prové d'un desequilibri entre les reaccions prooxidants i les antioxidants, que decanten la balança cap al dany cel·lular.

Malgrat l'associació de les ROS amb la promoció de lesions oxidatives, cal destacar que aquestes molècules són importants elements de comunicació entre els mitocondris i la resta de la cèl·lula. A través de

l'activació de varies proteïnes, les ROS regulen la senyalització de varis processos biològics i fisiològics. Per tant, mentre nivells elevats de ROS es relacionen amb esdeveniments oxidants, baixos nivells funcionen com a segons missatgers de respostes cel·lulars encaminades al manteniment de l'homeòstasi i a l'adaptació per fer front a l'estrès (Chandel 2015).

1.2.5. La disfunció mitocondrial

La disfunció mitocondrial es defineix com la disminució de la biogènesi mitocondrial i l'alteració tant del potencial de membrana com de l'activitat de la cadena de transport electrònic, amb la conseqüent disminució dels nivells d'ATP (Bhatti *et al.* 2016). La disfunció mitocondrial és el resultat de la producció excessiva de ROS, associada al dany oxidatiu de proteïnes, DNA i lípids mitocondrials. Els mitocondris regulen molts processos de la cèl·lula, de manera que l'alteració de la seva homeòstasi condueix a dèficits severs en les funcions cel·lulars, que poden conduir a lesions dels teixits i òrgans. De fet, la disfunció mitocondrial està associada a l'envelliment i a diverses condicions patològiques, com algunes malalties degeneratives i algunes malalties agudes i cròniques (fig. 5) (Cameron *et al.* 2016). Per això, molta de la recerca encaminada al disseny de noves estratègies terapèutiques se centren actualment en el mitocondri com a orgànul diana (Cameron *et al.* 2016).

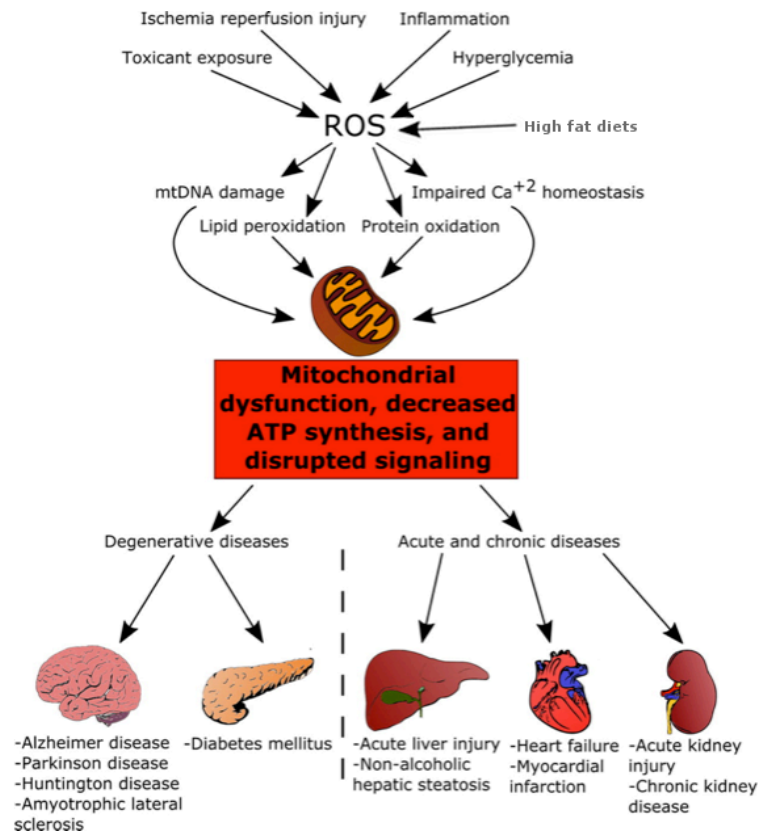


Figura 5. Malalties associades a la disfunció mitocondrial. ROS, espècies reactives d'oxigen. (Modificat de Cameron *et al.* 2016).

Al fetge, la disfunció mitocondrial es relaciona amb el desenvolupament de lesions agudes i de malalties cròniques com la NAFLD, l'hepatocarcinoma o la malaltia hepàtica alcohòlica (Auger *et al.* 2015). Concretament, les anomalies mitocondrials associades a la NAFLD inclouen lesions ultraestructurals, la reducció dels nivells de mtDNA i la disminució de l'activitat de la cadena de transport electrònic i de la producció d'ATP (Begrache *et al.* 2006; Paradies *et al.* 2014). Per contra, l'oxidació mitocondrial d'àcids grassos es pot activar al fetge per tal de contrarestar l'augment de lípids intracel·lulars, tot i que aquesta adaptació no és suficient per reduir l'acumulació de lípids al fetge. A més, la formació de ROS augmenta degut al desajust entre l'augment de l'oxidació mitocondrial i el funcionament ineficient de la cadena de transport electrònic (Begrache *et al.* 2013).

1.3. Esteatosi hepàtica

L'esteatosi hepàtica es defineix com l'acumulació de TG al fetge (més d'un 5% del pes del fetge) en absència d'un consum diari d'alcohol de més de 20 o 30 g en dones i homes, respectivament. Constitueix l'escalafó més baix de l'ampli espectre de situacions patològiques englobades baix el terme de la NAFLD (fig. 6). La NAFLD ha esdevingut la causa més freqüent de malaltia crònica del fetge arreu del món, amb una prevalença d'un 20–30% en adults (Byrne & Targher 2015; Buzzetti *et al.* 2016). A banda del consum d'alcohol, altres causes d'esteatosi hepàtica són excloses de la NAFLD, com la malaltia autoimmune del fetge, la infecció vírica hepàtica, l'hemocromatosi, la malaltia de Wilson o el consum de drogues (Asrih & Jornayvaz 2015). Canvis saludables en l'estil de vida poden revertir l'esteatosi; en cas contrari aquest estat pot progressar a esteatohepatitis no alcohòlica (NASH, de l'anglès *nonalcoholic steatohepatitis*). La NASH inclou, a més de l'esteatosi, la presència de lesions hepàtiques i inflamació, acompanyats o no de fibrosi. Els pacients amb NASH poden desenvolupar cirrosi, que incrementa la susceptibilitat de patir hepatocarcinoma (Cohen *et al.* 2011; Buzzetti *et al.* 2016).

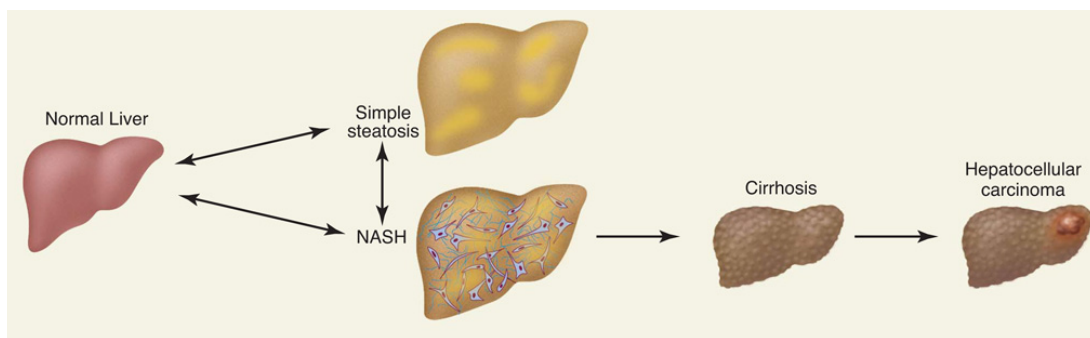


Figura 6. Representació esquemàtica de la progressió de la NAFLD. NASH, esteatohepatitis no alcohòlica. (Extret de Cohen *et al.* 2011).

Tradicionalment, la progressió de la NAFLD s'ha considerat des d'una perspectiva anomenada "two hits hypothesis" o hipòtesi de doble impacte (Day & James 1998). Segons aquesta hipòtesi, una vida

sedentària, la ingesta de dietes hiperlipídiques, l'obesitat i la resistència a la insulina actuarien com a “primer impacte” per a l'acumulació de lípids al fetge. En aquesta situació, els hepatòcits estarien més predisposats a patir un “segon impacte”, que resultaria en les característiques pròpies de la NASH, com la inflamació, la fibrosi o la mort cel·lular. El “segon impacte” contempla diversos factors, com l'estrès oxidatiu, l'estrès del reticle endoplasmàtic, la disfunció mitocondrial, citocines i adipocines proinflamatòries o l'alteració de la microbiota intestinal (Yilmaz 2012).

Aquesta visió, massa simplista per a recapitular la complexitat de la NAFLD, s'ha substituïda per la “multiple parallel hit hypothesis” o hipòtesi d'impactes múltiples paral·lels, segons la qual múltiples factors actuen de manera sinèrgica i paral·lelament sobre el desenvolupament i la progressió de la NAFLD, i no d'una manera consecutiva (Tilg & Moschen 2010). Per exemple, s'ha vist que la inflamació hepàtica pot precedir l'esteatosi simple (Gruben *et al.* 2014; Yu *et al.* 2016). A més, alguns d'aquests factors poden interaccionar entre ells, establint un cercle viciós.

1.3.1. Acumulació lipídica hepàtica. Relació amb la resistència a la insulina

La síndrome metabòlica ha esdevingut la principal causa de mortalitat i morbiditat als països industrialitzats, i es caracteritza per ser una combinació de múltiples desordres com la resistència a la insulina, l'obesitat, la dislipèmia, la hipertensió, la hipercolesterolèmia i l'estat proinflamatori, entre d'altres. La NAFLD s'associa a aquests esdeveniments i, de fet, es considera una manifestació d'aquesta síndrome (Asrih & Jornayvaz 2015). No obstant, la NAFLD també pot estar relacionada amb una predisposició genètica en individus sans i absents dels criteris propis de la síndrome metabòlica (Kantartzis *et al.* 2009).

La resistència a la insulina sembla jugar un paper clau en la promoció de la NAFLD (Asrih & Jornayvaz 2015). En situacions normals, la insulina s'uneix als seus receptors 1 i 2 transmembrana, provocant la seva dimerització i autofosforilació en residus de tirosina. Llavors es recluta i fosforila el substrat receptor d'insulina (IRS), que és capaç de modular la via de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) – AKT, la qual promou les accions metabòliques de la insulina (Boucher *et al.* 2014). Al fetge, l'acció de la insulina és essencial en el metabolisme dels carbohidrats. Per una part promou la captació de glucosa, la glucòlisi i la glucogenogènesi, mentre que també inhibeix la gluconeogènesi i la mobilització de glucogen. També modula el metabolisme lipídic, ja que inhibeix l'oxidació d'àcids grassos i promou la lipogènesi *de novo*, la captació d'àcids grassos i la secreció de VLDL (Vacca *et al.* 2015). Quan el teixit adipós esdevé resistent a l'acció de la insulina, s'afavoreix la lipòlisi dels TG, de manera que els NEFAs són alliberats a la circulació i poden ser captats per teixits perifèrics, com el múscul esquelètic i el fetge (fig. 7). L'acumulació intracel·lular de lípids al múscul esquelètic empitjora la captació de glucosa, per la qual cosa el pàncrees respon amb la secreció de més insulina (Hardy *et al.* 2016). L'acumulació excessiva de lípids al fetge esdevé d'un desequilibri entre la síntesi de TG (provinents tant de la seva captació i esterificació, com de la síntesi *de novo*) i el seu catabolisme (degut a la seva oxidació i secreció com a VLDL) (Yu *et al.* 2016). A més, en estats insulinoresistents l'acció de la insulina al fetge té un caràcter selectiu. Per una part, se sobreactiva SREBP-1c, de manera que els NEFAs són sintetitzats al fetge. No obstant, i per altra banda, la insulina és incapaç d'inhibir la producció de glucosa (Begrache *et al.* 2013). Els nivells elevats de glucosa, a més, activen ChREBP, que promou un empitjorament de l'esteatosi a través de l'augment de la lipogènesi (Vacca *et al.* 2015).

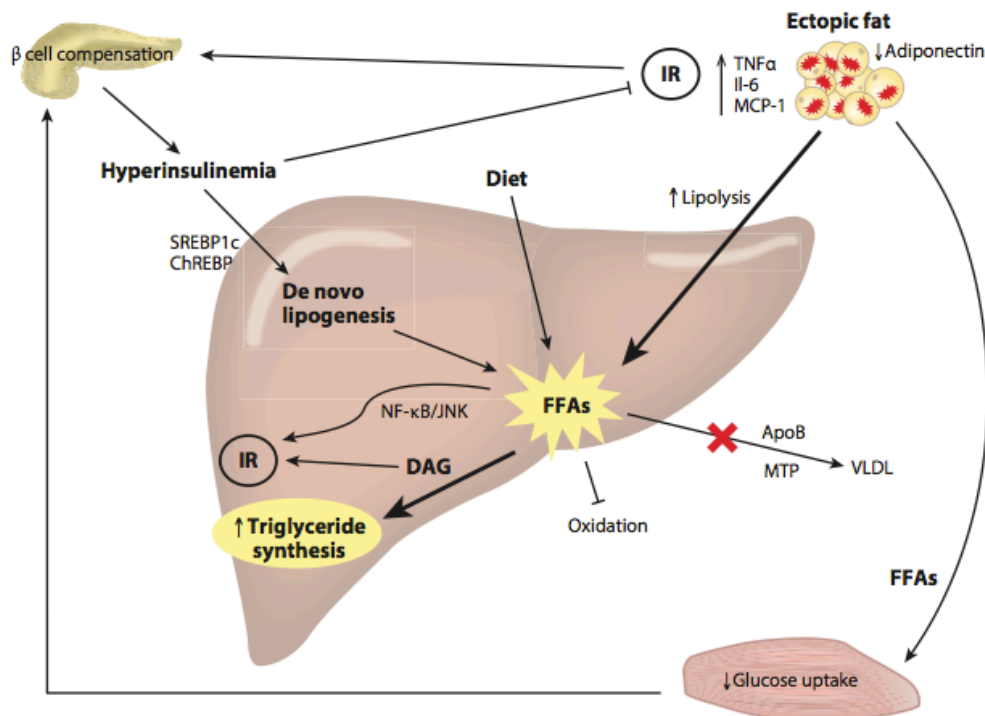


Figura 7. Principals processos que contribueixen a la resistència a la insulina i a l'esteatosi al fetge. IR, resistència a la insulina; TNF- α , factor de necrosi tumoral α ; IL-6, interleucina 6; MCP-1, proteïna 1 quimioattractant de monòcits; FFA, àcid gras lliure; ApoB, apolipoproteïna B; MTP, proteïna de transferència de triglicèrids microsomal; VLDL, lipoproteïnes de molt baixa densitat; DAG, diacilglicerol; NF- κ B/JNK, factor nuclear κ B; JNK, cinasa de l'extrem N-terminal de c-Jun; SREBP-1c, proteïna 1c d'unió a elements reguladors d'esterols; ChREBP, element de resposta als carbohidrats. (Extret de Hardy *et al.* 2016).

A més, l'acumulació de determinades espècies lipídiques, tals com els diacilglicerols (DAG), les ceramides o els SFA, es relaciona amb el desenvolupament de resistència a la insulina d'una manera més directa que no pas per l'acumulació de TG *per se* (Farese *et al.* 2012). Els DAG, les ceramides i els SFA indueixen la proteïna cinasa C (PKC), la qual disminueix la senyalització de la insulina (Chavez & Summers 2012; Galbo *et al.* 2013; Perry *et al.* 2014). A més, les ceramides estimulen l'acció de la cinasa de l'extrem N-terminal de c-Jun (JNK) i de la cinasa inhibidora d'I κ B (IKK2), cinases que promouen la inflamació i inhibeixen la senyalització de la insulina (Gruben *et al.* 2014).

1.3.2. Inflamació hepàtica

Nombroses proteïnes estan involucrades en la resposta inflamatòria al fetge. Algunes d'elles es relacionen alhora amb el desenvolupament de resistència a la insulina (fig. 7), de manera que esdevé difícil esclarir la relació causa–efecte en els successos relacionats amb la NAFLD (Gruben *et al.* 2014; Asrih & Jornayvaz 2015).

JNK és un membre de la família de les cinases activades per mitògens (MAPKs). Existeixen 3 isoformes, dues de les quals, JNK1 i JNK2, s'expressen a gairebé tots els tipus cel·lulars, inclosos els hepatòcits (Seki *et al.* 2012). La seva activació és el resultat d'una cascada organitzada de senyals: les MAP3Ks fosforilen i activen les MAP2Ks, les quals també fosforilen i activen la JNK, que finalment també fosforila algun dels seus substrats (fig. 8).

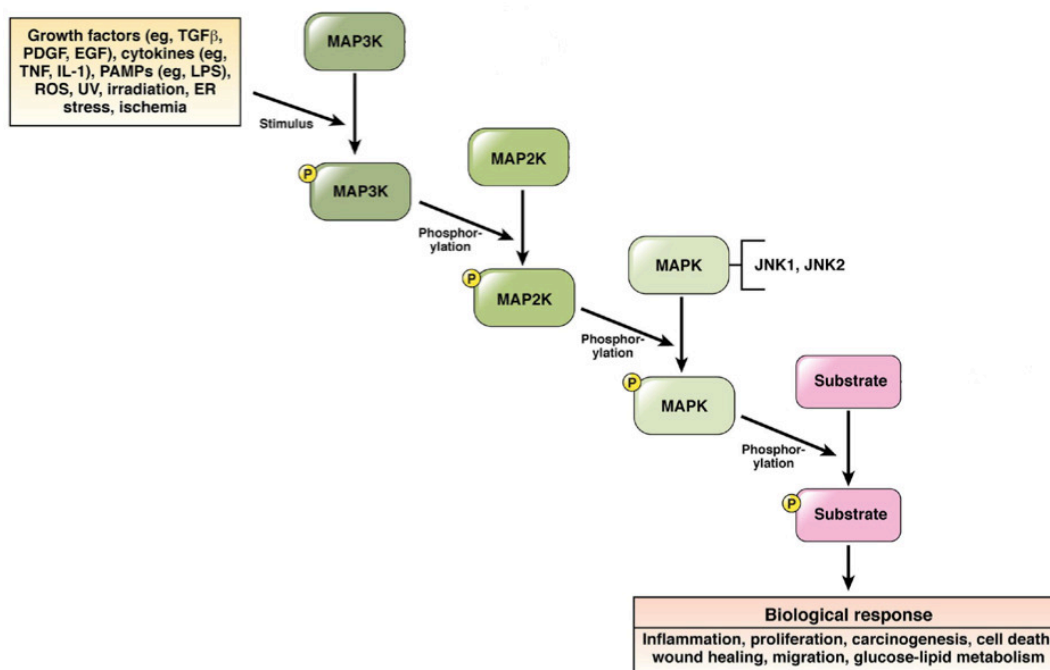


Figura 8. Sistema d'activació de la JNK. MAPK, cinasa activada per mitògens; TGFβ, factor de creixement transformant β; PDGF, factor de creixement derivat de les plaquetes; EGF, factor de creixement epidèrmic; TNF, factor de necrosi tumoral; IL, interleucina; PAMPs, patrons associats a patògens; LPS, lipopolisacàrid; ROS, espècies reactives d'oxigen; ER, reticle endoplasmàtic. (Modificat de Seki *et al.* 2012).

Al fetge, un cop activada JNK, regula processos com la inflamació, la mort cel·lular, la diferenciació i la proliferació, l'acumulació de ROS, la senyalització de la insulina i la carcinogènesi, entre d'altres. Varis estímuls indueixen l'activació de JNK, tals com citocines, factors de creixement, lipopolisacàrids, ROS, estrès del reticle endoplasmàtic o estrès ambiental, entre d'altres (Czaja 2010; Seki *et al.* 2012). L'activació de JNK constitueix un mecanisme central en el desenvolupament de l'obesitat i la resistència a la insulina i, per tant, de la progressió cap a lesions severes a l'hepatòcit. JNK és capaç de fosforilar IRS1 al residu Ser307, fet que provoca la interrupció de la senyalització de la insulina (Singh *et al.* 2009; Seki *et al.* 2012). Tot plegat, el control de l'activitat de JNK centra l'atenció de les estratègies terapèutiques per lluitar contra la patogènesi de la NAFLD (Singh *et al.* 2009). Altres MAPKs són les cinases 1 i 2 regulades per senyals extracel·lulars o la p38, tot i que la seva relació amb la NAFLD ha estat menys esclarida.

El factor nuclear κ B (NF- κ B) és un dels factors de transcripció més importants involucrats en la resposta inflamatòria, tot i que també s'ha vist que està implicat en l'etiologia de la resistència a la insulina. Quan IKK2 s'activa, fosforila l'inhibidor α de NF- κ B, amb la seva conseqüent ubiquitinització i degradació. D'aquesta manera NF- κ B és alliberat i translocat al nucli, on inicia la transcripció de gens proinflamatoris. Diversos estudis a ratolins mostren que formes constitutivament actives de IKK2 indueixen inflamació hepàtica i resistència a la insulina, mentre que ratolins *knockdown* per a IKK2 estan protegits enfront del desenvolupament de resistència a la insulina als hepatòcits (Arkan *et al.* 2005; Cai *et al.* 2005). Sembla que IKK2 podria induir la fosforilació en residus de serina de IRS1, inhibint d'aquesta manera la via de la insulina (Gao *et al.* 2002).

Una altra molècula important involucrada en la resposta inflamatòria és el factor de necrosi tumoral α (TNF- α). Al fetge, és secretat directament pels hepatòcits o per les cèl·lules de Kupffer (macròfags residents al

fetge), tot i que també és secretat pel teixit adipós (Braunersreuther *et al.* 2012). Nombrosos estudis situen TNF- α com un component clau en el desenvolupament de l'esteatosi, la resistència a la insulina i la inflamació hepàtiques a través dels efectes que exerceix sobre NF- κ B, IKK2, JNK i la síntesi de ceramides (Asrih & Jornayvaz 2013; Gruben *et al.* 2014).

Cal destacar que existeixen altres factors, a banda dels esmentats, amb un impacte significatiu sobre el desenvolupament de la NAFLD. D'una banda, la producció i secreció d'adipocines es veu alterada en estats insulinoresistents. Entre aquestes adipocines, i a més de TNF- α , destaquen la interleucina 6, la proteïna 1 quimioattractant de monòcits, l'adiponectina, la leptina i la resistina (Hardy *et al.* 2016). La pèrdua de l'homeòstasi del reticle endoplasmàtic, o estrès del reticle endoplasmàtic, provoca l'activació de diverses vies intracel·lulars (Pagliassotti 2012), mentre que l'alteració de la microbiota intestinal genera canvis en el metabolisme dels àcids grassos de cadena curta, un increment de la permeabilitat intestinal i l'alliberament de lipopolisacàrids (Leung *et al.* 2016). Tots aquests factors promouen l'esteatosi, la resistència a la insulina, la inflamació o la fibrosi hepàtica, conduint a la disfunció de l'hepatòcit.

1.3.3. Paper de l'AMPK als desordres hepàtics

L'AMPK constitueix un sensor energètic cel·lular, activat en resposta a una àmplia varietat d'estressos cel·lulars on els ratis AMP/ATP i ADP/ATP augmenten, ja sigui per un increment del consum d'ATP o per una disminució de la seva producció (Viollet *et al.* 2009). La funció principal de l'AMPK és la de promoure la producció d'ATP incrementant l'activitat i l'expressió de proteïnes involucrades en el catabolisme cel·lular (Hardie *et al.* 2012). L'AMPK és una proteïna heterotrimèrica composta per les subunitats α , β i γ . La subunitat α conté el domini de fosforilació, la β manté l'estructura de la proteïna i resulta essencial per a l'activitat enzimàtica en resposta a determinats activadors, mentre que

la subunitat γ conté la funció reguladora. L'AMPK es modula per control al·lostèric; l'ATP la inhibeix, mentre que l'AMP i l'ADP l'activen (Smith *et al.* 2016). La unió de l'AMP o l'ADP a la subunitat γ promou la fosforilació d'AMPK al residu Thr172 de la subunitat catalítica (Viollet *et al.* 2009). En concret, al fetge, l'activació de l'AMPK disminueix la lipogènesi a través de la fosforilació i inactivació d'ACC i de la HMG-CoA reductasa, de manera que inhibeix la síntesi *de novo* d'àcids grassos i de colesterol, respectivament. La lipogènesi també se suprimeix per part de l'AMPK a través de la disminució de l'acció transcripcional de SREBP-1c i ChREBP. A més, l'AMPK també estimula la β -oxidació a través de la disminució dels nivells del malonil-CoA, efecte produït tant per la inactivació d'ACC com per l'increment de l'activitat de la malonil-Coa descarboxilasa. Finalment, l'AMPK hepàtica controla també l'homeòstasi de la glucosa, inhibint la gluconeogènesi a través de la regulació de l'expressió i activitat de PEPCCK i G6Pasa.

Tot i que els desordres mitocondrials associats a l'esteatosi hepàtica condueixen a una depleció d'ATP, l'activitat d'AMPK sembla minvada en aquestes condicions, apuntant al fet que altres elements podrien estar controlant l'AMPK, com diversos factors inflamatoris (Smith *et al.* 2016). Durant la darrera dècada, s'han estudiat nombrosos compostos per millorar la NAFLD en models animals a través del increment de l'activitat d'AMPK (Smith *et al.* 2016). Així, varies drogues naturals i sintètiques modulen l'activitat d'AMPK a través de diferents mecanismes d'actuació. Entre aquests composts destaquen: l'AICAR, el compost A-769662, els polifenols, les biguanides (metformina i fenformina) o les tiazolidinediones (TZDs), entre d'altres (Viollet *et al.* 2009).

L'AICAR és un nucleòsid permeable a la cèl·lula que es converteix en un compost amb similituds estructurals a l'AMP, de manera que pot mimetitzar-ne els seus efectes al·lostèrics. El compost A-769662 també incrementa l'activitat de l'AMPK a través d'activació al·lostèrica i de la inhibició de la seva desfosforilació. En canvi, els polifenols, tals com el resveratrol, activen l'AMPK a través de l'activació de la sirtuïna 1,

una deacetilasa dependent de NAD que modula el metabolisme cel·lular. La metformina, un agent antihiperoglucemiant molt utilitzat en la teràpia de la diabetis tipus 2, exerceix els seus efectes mitjançant la inhibició del complex I de la cadena de transport electrònic, la qual cosa provoca un augment del rati AMP/ATP i l'activació d'AMPK (Viollet *et al.* 2012; Smith *et al.* 2016).

1.3.4. Efectes protectors de les TZDs sobre la progressió de la NAFLD. Paper de l'adiponectina

Les TZDs, com la rosiglitazona (Rsg), la pioglitazona i la troglitazona, són lligands d'elevada afinitat pel PPAR γ del teixit adipós, de manera que afavoreixen la unió dels dímers PPAR γ -RXR als PPREs. D'aquesta manera, incrementen tant l'adipogènesi i la capacitat d'emmagatzemar lípids, com la sensibilitat a la insulina (Tontonoz & Spiegelman 2008). Com a resultat, les TZDs redueixen la lipèmia, la glucèmia i l'acumulació ectòpica de lípids. Degut a aquests efectes beneficiosos, les TZDs s'han usat en el tractament de la resistència a la insulina (Olefsky 2000; Yki-Järvinen 2004).

A més, les TZD estimulen l'expressió i la secreció d'adiponectina, adipocina que ha estat àmpliament reconeguda pels seus efectes anti-diabètics, anti-inflamatoris, anti-aterogènics i cardioprotectors (Nigro *et al.* 2014a). Aquesta adipocina se sintetitza com un monòmer de 28–30 kDa i es troba a la circulació formant estructures homèriques de pes molecular variable. Als òrgans i teixits diana, exerceix els seus efectes a través de les cascades de senyals activades després de la unió als seus receptors AdipoR1, AdipoR2 i T-cadherina. Dels tres, AdipoR2 presenta una expressió majoritàriament restringida al fetge (Ruan & Dong 2016).

Els nivells sèrics d'adiponectina es troben disminuïts en diverses condicions fisiopatològiques, com l'obesitat, la resistència a la insulina, la diabetis tipus 2, la síndrome metabòlica o la NAFLD, entre d'altres (Kadowaki *et al.* 2006; Silva *et al.* 2014). Al fetge, l'adiponectina pren

gran rellevància en els efectes hepatoprotectors de les TZDs, juntament amb altres senyals emeses pel teixit adipós, com el menor alliberament d'àcids grassos a la circulació (Kadowaki *et al.* 2006; Huang *et al.* 2013; Vacca *et al.* 2015).

Els efectes que produeix l'adiponectina al fetge inclouen la disminució de la gluconeogènesi, de l'esteatosi, de la resistència a la insulina, de la inflamació i de la fibrosi (Silva *et al.* 2014). Aquestes respostes són possibles per la interacció del receptor amb la proteïna adaptadora APPL1 i de la subseqüent activació de les vies d'AMPK i de PPAR α (fig. 9).

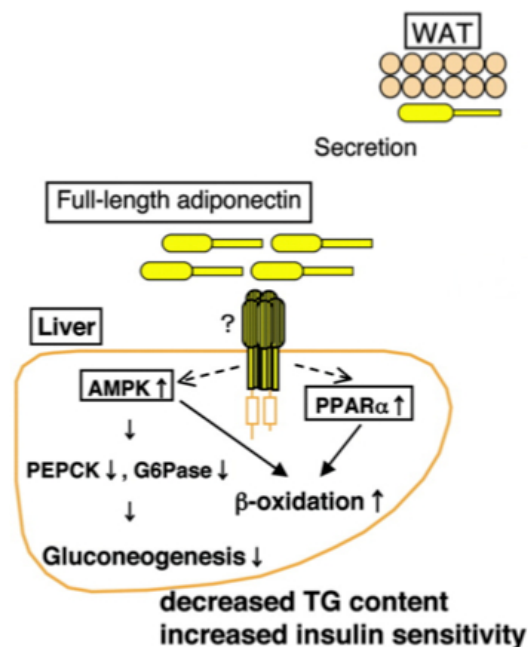


Figura 9. Activació d'AMPK i PPAR α al fetge en resposta a l'adiponectina. AMPK, cinasa activada per AMP; PEPCK, fosfoenolpiruvat carboxicinas; G6Pase, glucosa-6-fosfatasa; PPAR α , receptor activat per proliferadors peroxisomals α . (Modificat de Kadowaki & Yamauchi 2005).

1.4. Dimorfisme sexual en la malaltia del fetge gras i en la funció i la biogènesi mitocondrials: paper dels estrògens

Els estrògens s'han postulat com a elements rellevants en la regulació de funcions fisiològiques i metabòliques, de manera que un coneixement profund de les vies de senyalització on actuen podria contribuir a la prevenció i tractament de malalties diverses. De fet, en dones postmenopàusiques i en rosegadors ovariectomitzats (OVX), la supressió de la funció ovàrica i la pèrdua del principal estrogen circulant durant l'edat reproductora femenina, el 17β -estradiol (E2), es relacionen amb un augment de l'obesitat central i de la resistència a la insulina i amb un increment del risc de patir complicacions com l'esteatosi hepàtica i la diabetis tipus 2 (Gupte *et al.* 2015). La protecció estrogènica també s'ha evidenciat en estudis amb humans, ja que s'ha vist que la sensibilitat a la insulina és més elevada en dones que en homes (Kuhl *et al.* 2005; Geer & Shen 2009). A més, la prevalença de la NAFLD és menor en dones premenopàusiques en comparació als homes de la mateixa edat i a dones postmenopàusiques (Clark *et al.* 2002; Browning *et al.* 2004; Tsuneto *et al.* 2010; Hamaguchi *et al.* 2012; Pan & Fallon 2014). En comparació amb les rates femella, els mascles no obesos presenten una menor sensibilitat sistèmica a la insulina i una menor resposta hepàtica a la insulina (Nadal-Casellas *et al.* 2012), així com un major grau d'acumulació de lípids al fetge en resposta a una dieta hiperlipídica (Stöppeler *et al.* 2013).

Com s'ha indicat a l'apartat 1.2.5., la disfunció mitocondrial de l'hepatòcit es relaciona amb el desenvolupament de complicacions al fetge, com la resistència a la insulina, l'esteatosi o la progressió de la NAFLD. Per això, la modulació del contingut mitocondrial i de la seva funció esdevé una diana terapèutica rellevant en la lluita contra el desenvolupament de malalties hepàtiques (Cameron *et al.* 2016). En aquesta línia d'investigació, estudis previs duts a terme al nostre laboratori han posat de manifest l'existència d'un dimorfisme sexual en

la funció i biogènesi mitocondrials en varis teixits de rata, com el fetge (Justo *et al.* 2005a; Valle *et al.* 2007; Nadal-Casellas *et al.* 2010), el WAT (Amengual-Cladera *et al.* 2012a), el teixit adipós marró (Nadal-Casellas *et al.* 2013), el múscul esquelètic (Colom *et al.* 2007; Gómez-Pérez *et al.* 2008) o el cervell (Guevara *et al.* 2009). En tots ells, les rates femella presenten mitocondris més diferenciats que els dels mascles, amb una capacitat oxidativa més elevada, així com una major capacitat antioxidant. Altrament, estudis amb rates OVX han posat de manifest alteracions de la biogènesi i funció mitocondrials als músculs esquelètic (Capllonch-Amer *et al.* 2014a) i cardíac (Sbert-Roig *et al.* 2016), i al teixit adipós marró (Nadal-Casellas *et al.* 2011), efectes que són parcialment revertits després de l'administració d'E2. Estudis *in vitro* en miotubs L6E9 (Capllonch-Amer *et al.* 2014a), cardiomiòcits H9c2 (Sbert-Roig *et al.* 2016) i adipòcits 3T3-L1 (Capllonch-Amer *et al.* 2014b), recolzen l'efecte potenciador de la funció i la biogènesi mitocondrials per part de l'E2. Treballs desenvolupats en altres laboratoris també suggereixen i recolzen el paper de l'E2 en la funció i la biogènesi mitocondrials en altres teixits i cultius cel·lulars, com a vasos sanguinis cerebrals, cèl·lules d'adenocarcinomes de mama i pulmó, astròcits o cervell (Stirone *et al.* 2005; Mattingly *et al.* 2008; Guo *et al.* 2013b; Gaignard *et al.* 2015).

Mecanisme d'acció de l'E2

L'E2 difon a través de la membrana plasmàtica i s'uneix als receptors d'estrògens α i β (ER α i ER β). Quan l'E2 s'uneix als ERs, aquests dimeritzen i es transloquen al nucli, on s'uneixen als elements de resposta a estrògens (EREs) i promouen la transcripció de gens involucrats en diferents funcions (fig. 10). Els ERs també poden interaccionar amb altres factors de transcripció, com Sp1 o AP1, activant l'expressió dels gens que codifiquen (Klinge 2001). Llevat d'aquests efectes genòmics, l'E2 unit al ER pot exercir efectes ràpids no genòmics mediats per la seva interacció amb altres proteïnes com MAPK, proteïnes

G, PI3K o PKC, entre d'altres (Gupte *et al.* 2015). A més, una fracció dels ERs es troben al mitocondri, des d'on podrien contribuir directament a l'estimulació de la funció mitocondrial per interacció amb EREs propis de l'orgànul (Chen & Yager 2004).

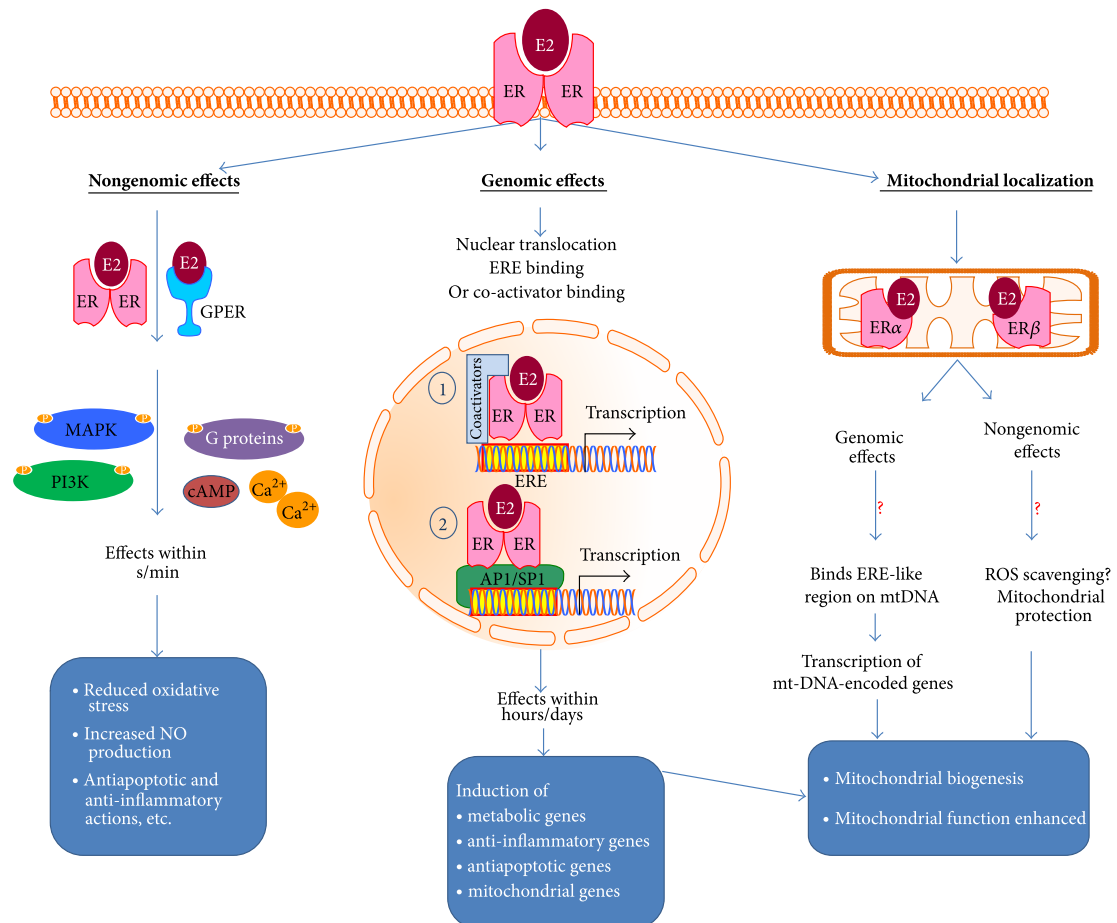


Figura 10. Mecanismes d'acció dels estrògens. E2, 17β-estradiol; ER, receptor d'estrògens; GPER, receptor d'estrògens associat a proteïnes G; MAPK, cinasa activada per mitògens; PI3K, fosfatidilinositol 3-cinasa; ERE, element de resposta a estrògens. (Extret de Gupte *et al.* 2015).

Existeix un tercer receptor d'estrògens associat a proteïnes G (GPER), menys estudiat, detectat al cor, pulmó, fetge, intestí, ovari, ronyó i cervell (Olde & Leeb-Lundberg 2009). El GPER és també capaç de modular les respostes no genòmiques dels estrògens a través de la fosforilació de les MAPKs i PI3K o mobilitzar el calci (Prossnitz & Barton 2011), tot i que també s'han descrit alguns efectes genòmics al cor, com ara la inhibició de l'expressió del factor α induïble per hipòxia i del factor de creixement del teixit connectiu (De Francesco *et al.* 2013).

Els mecanismes d'actuació de l'E2 sobre la funció i la biogènesi mitocondrials es basen en la unió dels ERs al promotor de NRF1, de manera que augmenten els nivells de TFAM, del mtDNA o de components de la cadena de transport electrònic (Ivanova *et al.* 2013). De tota manera, sembla que aquest no és l'únic punt susceptible de ser regulat pels estrògens, ja que també s'ha detectat un augment en l'expressió de PGC-1 α o PGC-1 β en resposta a l'E2 a cardiomiòcits i en adipòcits 3T3-L1 (Hsieh *et al.* 2005; Capllonch-Amer *et al.* 2014b; Sbert-Roig *et al.* 2016).

A més de la funció i la biogènesi mitocondrials, els estrògens també regulen l'estat redox cel·lular, propietat que no sols es limita a la funció antioxidant de la seva estructura fenòlica. Les femelles de diverses espècies de mamífers presenten menor estrès oxidatiu, associat a l'increment de l'activitat i expressió d'enzims antioxidants (Borrás *et al.* 2010; Viña *et al.* 2013; Valencia *et al.* 2016). Els nostres estudis previs al fetge mostren que les rates femella, en comparació a les mascle, presenten majors activitats glutatió peroxidasa i SOD (Nadal-Casellas *et al.* 2010), recolzant l'efecte protector dels estrògens. A més a més, els efectes protectors de l'E2 enfront de l'estrès oxidatiu provocat per l'envelliment s'han descrit al fetge de rates mascle tractades amb E2, les quals minven l'estrès oxidatiu a través de la recuperació parcial de les activitats SOD, catalasa i glutatió peroxidasa (Hamden *et al.* 2007).

2. OBJECTIUS I PLANTEJAMENT EXPERIMENTAL

El treball realitzat en aquesta tesi doctoral s'inclou dins la línia d'investigació que desenvolupa el Grup de Metabolisme Energètic i Nutrició de la UIB, centrada en l'estudi dels mecanismes moleculars implicats en el dimorfisme sexual existent en la funció i la biogènesi mitocondrials, i la seva associació amb diverses patologies relacionades amb la resistència a la insulina i la lipotoxicitat.

L'objectiu general d'aquesta tesi doctoral s'ha centrat en l'estudi del paper dels estrògens en la modulació de la funció i la biogènesi mitocondrials al fetge, i la contribució d'aquestes hormones a l'alleujament de l'esteatosi i la resistència a la insulina hepàtiques. Per a la consecució d'aquest objectiu s'han combinat estudis *in vivo*, utilitzant rates Wistar d'ambdós sexes i femelles ovariectomitzades, amb experiments *in vitro*, utilitzant la línia cel·lular humana d'hepatòcits HepG2.

El principal antecedent en el qual es fonamenten els estudis duts a terme en la present tesi doctoral és l'existència d'un dimorfisme sexual en la funció i la biogènesi mitocondrials al fetge de rates prèviament descrita pel grup de recerca (Justo *et al.* 2005a; Valle *et al.* 2007; Nadal-Casellas *et al.* 2010). En aquests estudis es va posar de manifest una major capacitat antioxidant i una població mitocondrial més diferenciada al fetge de rates femelles, amb mitocondris més grans i amb major capacitat oxidativa en comparació amb el fetge de rates mascle (Justo *et al.* 2005a; Valle *et al.* 2007; Nadal-Casellas *et al.* 2010).

Estudis realitzats en un model de rates ovariectomitzades i suplementades amb E2 havien suggerit un efecte modulador dels estrògens sobre la funció i la biogènesi mitocondrials en els músculs esquelètic (Capllonch-Amer *et al.* 2014a) i cardíac (Sbert-Roig *et al.* 2016), així com en els teixits adiposos blanc (Amengual-Cladera *et al.* 2012b) i marró (Nadal-Casellas *et al.* 2011). Paral·lelament, els resultats obtinguts *in vitro* en adipòcits 3T3-L1 (Capllonch-Amer *et al.* 2014b), miotubs L6E9 (Capllonch-Amer *et al.* 2014a) i cardiomiòcits

H9c2 (Sbert–Roig *et al.* 2016) posaven de manifest un efecte de l'E2 millorant el funcionament del mitocondri.

El fetge és un òrgan central que controla el metabolisme energètic i la disponibilitat de nutrients per a la resta de teixits de l'organisme, processos dependents del correcte funcionament del mitocondri. El dimorfisme sexual descrit a la funció mitocondrial hepàtica i l'alteració del funcionament dels hepatòcits en situacions de privació d'estrògens, com és en el cas de dones postmenopàusiques i animals ovariectomitzats, posen de manifest la implicació dels estrògens en la regulació de la funció mitocondrial del fetge. En aquesta línia, el **primer objectiu** de la present tesi doctoral s'ha centrat en dilucidar els elements que participen en l'efecte modulador de l'E2 sobre la funció mitocondrial al fetge, posant especial atenció als PGC-1 α i PGC-1 β , principals reguladors d'aquest procés (Scarpulla 2011). Amb aquest fi, es va utilitzar el model d'ovariectomia com una eina efectiva de manipulació de l'estat hormonal. Es van emprar rates Wistar de 14 setmanes d'edat, ovariectomitzades a les 5 setmanes, a la meitat de les quals se'ls hi va administrar E2 (10 μ g/kg/48h) durant les 4 setmanes prèvies al sacrifici. Al fetge, es van determinar marcadors de funció i biogènesi mitocondrials, així com també d'estrès oxidatiu. Per tal d'analitzar la implicació dels PGC-1 α i PGC-1 β , es van realitzar experiments de silenciament de l'expressió gènica en hepatòcits HepG2, que foren posteriorment tractats amb E2. Els principals resultats obtinguts i la discussió corresponent apareixen a l'apartat 4.1., i s'han recollit en un article publicat a la revista *Journal of Endocrinology* (Galmés–Pascual *et al.* 2017), que es troba inclòs a l'annex 1.

L'acumulació excessiva de lípids al fetge, anomenada esteatosi, constitueix la manifestació bàsica de les patologies associades a la malaltia del fetge gras no alcohòlic (NAFLD). L'agreujament de l'esteatosi pot evolucionar cap a alteracions cel·lulars irreversibles que comprometen el funcionament del fetge, per la qual cosa la intervenció primerenca resulta d'una importància cabdal per a la prevenció de

l'avanç de la malaltia. La prevalença de la NAFLD és creixent avui en dia, fenomen lligat també a la progressió de la síndrome metabòlica i dels seus components, com la resistència a la insulina. És destacable el fet que l'esteatosi i les complicacions derivades són més comuns a homes que a dones premenopàusiques, de manera que no es pot descartar que els estrògens puguin exercir un efecte hepatoprotector contra la NAFLD. Atès que la disfunció mitocondrial s'ha postulat com un element important en la patogènesi de la NAFLD (Pessayre & Fromenty 2005; Cameron *et al.* 2016), aquests efectes protectors dels estrògens podrien venir explicats, almenys en part, per la regulació que exerceixen sobre els mitocondris.

Tenint en compte aquestes consideracions, el **segon objectiu** ha estat analitzar els efectes dels estrògens sobre l'esteatosi hepàtica, la resistència a la insulina i la disfunció mitocondrial al fetge, situacions induïdes per una situació de lipotoxicitat. Per assolir aquest objectiu, s'ha avaluat l'efecte que exerceix l'E2 sobre l'expressió de gens implicats al metabolisme lipídic, així com la seva dependència de l'activació de la via de les MAPK. També s'han analitzat els efectes de l'E2 en la modulació de la resposta a la insulina i de la funció mitocondrial al fetge, i la implicació que té JNK en aquests processos. En aquest sentit, s'ha descrit que l'activació d'AMPK atenua l'esteatosi a través de la promoció del catabolisme cel·lular i la inhibició de la lipogènesi (Viollet *et al.* 2009), mentre que l'activació de la JNK pot promoure resistència hepàtica a la insulina (Singh *et al.* 2009; Seki *et al.* 2012). El plantejament experimental es va basar en la utilització de rates Wistar d'ambdós sexes de 24 setmanes d'edat, alimentades durant 16 setmanes amb una dieta hiperlipídica suplementada amb sacarosa. Per tal d'analitzar la resposta a la insulina, la meitat dels animals van rebre una injecció d'insulina (5U per kg de pes corporal) 20 min abans del sacrifici. L'ús de dietes riques en greixos constitueix el model nutricional més comunament usat per induir esteatosi al fetge. A més a més, la presència de sacarosa (50% fructosa) promou la síndrome

metabòlica, l'obesitat i la producció de lípids al fetge (Basciano *et al.* 2005; Kucera 2014). A banda de varis paràmetres sèrics, es van determinar al fetge els nivells de marcadors del metabolisme lipídic, de funció mitocondrial i de senyalització a la insulina, així com l'estat d'activació d'AMPK i JNK. A més d'aquest model *in vivo*, els estudis es van complementar amb experiments en cèl·lules HepG2 tractades amb palmitat per induir esteatosi, i amb E2 per analitzar la influència d'aquesta hormona. Amb el fi d'estudiar la via de senyalització de la insulina, els hepatòcits també es van estimular durant 15 min amb insulina. Es va determinar l'acumulació de greix als hepatòcits, així com l'expressió de gens involucrats al metabolisme lipídic. A més, es van analitzar marcadors de funció i biogènesi mitocondrials i de senyalització de la insulina, així com l'estat d'activació d'AMPK i de JNK. Els resultats i la discussió derivats d'aquest objectiu s'inclouen a l'apartat 4.2. i formen part d'un manuscrit que es troba en fase de publicació.

La resistència a la insulina és un dels factors claus en la promoció de la NAFLD, de manera que estratègies encaminades a interferir sobre aquest estat són d'una importància rellevant per combatre la NAFLD. Les TZDs, entre elles la rosiglitazona, milloren la sensibilitat a la insulina en models animals i humans insulinoresistents, per la qual cosa suposen una eina interessant en l'estudi de la reversió de la disfunció metabòlica generada per l'alimentació amb dietes hiperlipídiques. A més, les TZDs afavoreixen la secreció d'adiponectina per part dels adipòcits, hormona que té múltiples propietats beneficioses sobre l'alleujament de desordres hepàtics associats a la NAFLD (Silva *et al.* 2014). El **tercer objectiu** de la present tesi doctoral s'ha basat en analitzar el dimorfisme sexual en els efectes de la rosiglitazona sobre la resistència a la insulina, l'acumulació de lípids, la senyalització de l'adiponectina i la funció mitocondrial al fetge. Per assolir tal fi, es va utilitzar el mateix model *in vivo* emprat pel segon objectiu afegint un grup addicional de rates alimentades amb dieta hiperlipídica suplementada amb

rosiglitazona, durant les dues darreres setmanes de tractament dietètic. A les 24 setmanes d'edat es van sacrificar els animals i s'analitzaren paràmetres sèrics, i al fetge, la via de senyalització de la insulina i de l'adiponectina, a més de marcadors del metabolisme lipídic i de funció mitocondrial. Els resultats i la discussió pertinents es troben a l'apartat 4.3. de la present tesi doctoral.

3. MATERIALS I MÈTODES

3.1. Metodologia *in vivo*

3.1.1. Animals i tractaments

Totes les manipulacions dels animals es van dur a terme d'acord amb les directrius aprovades per la Unió Europea (2010/63/UE) i el Comitè d'Ètica d'Experimentació Animal de la UIB. Els animals van ser estabulats a una temperatura de 22°C i una humitat relativa del 65±3%, amb un cicle de 12h llum/obscuritat i lliure accés a l'aigua i pinso (Scientific Animal Food & Engineering –SAFE–, París, França).

Els experiments es realitzaren amb rates (*Rattus norvegicus*) de la soca Wistar adquirides a Charles River Laboratories (Barcelona, Espanya), on també van ser ovariectomitzades per a l'experiment pertinent. Després de la seva arribada a l'estabulari de la UIB, els animals van estar en període de quarantena i d'adaptació durant dues setmanes.

En el moment del sacrifici totes les rates femella es trobaven a la mateixa fase del cicle estral, el diestre, per tal de minimitzar variacions degudes a canvis hormonals. Per a verificar-ho, es va determinar rutinàriament la impedància de la mucosa de la paret vaginal mitjançant el monitor de cicle estral Impeast® (Cibertec, Madrid, Espanya), ja que existeix una relació entre aquesta resistència elèctrica i les fases del cicle estral (Bartos 1977). Aquestes mesures es van confirmar per microscòpia a través de l'examen citològic del frotis vaginal, atès que les hormones ovàriques exerceixen efectes molt evidents sobre l'epiteli vaginal.

3.1.1.1. Experiment amb rates ovariectomitzades

Es van utilitzar rates femelles control (n=6) i rates ovariectomitzades (OVX, n=12) a les 5 setmanes d'edat amb l'objectiu de suprimir la producció d'hormones ovàriques (fig. 11). Els animals es van alimentar amb dieta estàndard durant tot l'experiment (A04, SAFE). A les 10 setmanes d'edat, la meitat dels animals OVX (OVX+E2, n=6) van ser

tractats amb E2 (Sigma–Aldrich, St Louis, Missouri, Estats Units) mitjançant injecció subcutània (10 µg per kg de pes corporal) cada 48h durant les 4 setmanes prèvies al sacrifici. La resta dels animals (OVX, n=6) va rebre dosis similars del vehicle en el qual estava dissolt l'E2, oli de blat de moro (Sigma–Aldrich). Es van dur a terme controls setmanals del pes corporal i de la ingesta. A les 14 setmanes d'edat, i després d'un període en dejú de 12h, es van sacrificar totes les rates.

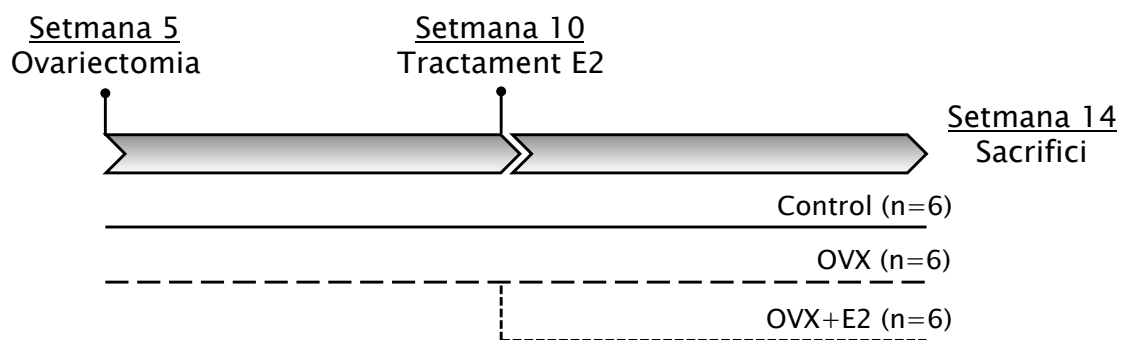


Figura 11. Fases del desenvolupament de l'estudi amb rates OVX i suplementades amb E2. OVX, rates ovariectomitzades; OVX+E2, rates OVX tractades amb 17β-estradiol.

3.1.1.2. Experiment amb rates alimentades amb dieta hiperlipídica i sotmeses a tractament farmacològic

Es van utilitzar rates d'ambdós sexes de 8 setmanes d'edat dividides en varis grups experimentals, amb pes corporal inicial similar a cada sexe. La composició de la dieta utilitzada en cada cas es detalla a la taula 1. Cada dues setmanes es realitzaren controls del pes corporal i de la ingesta, llevat de les dues darreres, durant les quals es feren diàriament. Totes les rates es van sacrificar a les 24 setmanes d'edat.

Taula 1. Composició nutritiva i calòrica de les dietes emprades (en % de contingut energètic total). Font: SAFE.

	Dieta control	Dieta hiperlipídica
Aportació calòrica (kcal/kg de pinso)	3438	4397
Proteïnes (%)	22,8	15,6
Lípids (%)	13,1	46
<i>Saturats</i>	4,5	17
<i>Monoinsaturats</i>	6	21,8
<i>Poliinsaturats</i>	2,6	7,2
Glúcids (%)	64,1	38,5
<i>Sacarosa</i>	-	26,7
<i>Glucosa</i>	44,2	-

Els grups animals experimentals van ser els següents (fig. 12):

- Grup control: rates alimentades amb una dieta estàndard durant 16 setmanes (210, SAFE).
- Grup HFD: rates alimentades amb dieta hiperlipídica (HFD) rica en sacarosa durant 16 setmanes (235, SAFE). L'ús d'aquesta dieta comercial permet obtenir guanys del pes corporal i de la massa adiposa, així com també reduir la tolerància a la glucosa i promoure el desenvolupament de resistència a la insulina.
- Grup HFD+Rsg: rates alimentades amb HFD durant 16 setmanes i suplementades amb el fàrmac antidiabetogènic rosiglitazona (Rsg, Sequoia Research Products, Pangbourne, Regne Unit) durant les dues darreres setmanes prèvies al sacrifici. La Rsg s'administrà unida a la dieta (100 mg per kg de pinso), la qual cosa equival a una dosi aproximada de 4 mg de Rsg per kg de pes corporal per dia.

La meitat dels animals van rebre una injecció intraperitoneal d'insulina (5 U per kg de pes corporal) 20 min abans del sacrifici amb l'objectiu d'analitzar la sensibilitat tissular a la insulina. Els grups de rates no

estimulats van ser tractats amb el volum equivalent del vehicle de la insulina, sèrum salí.

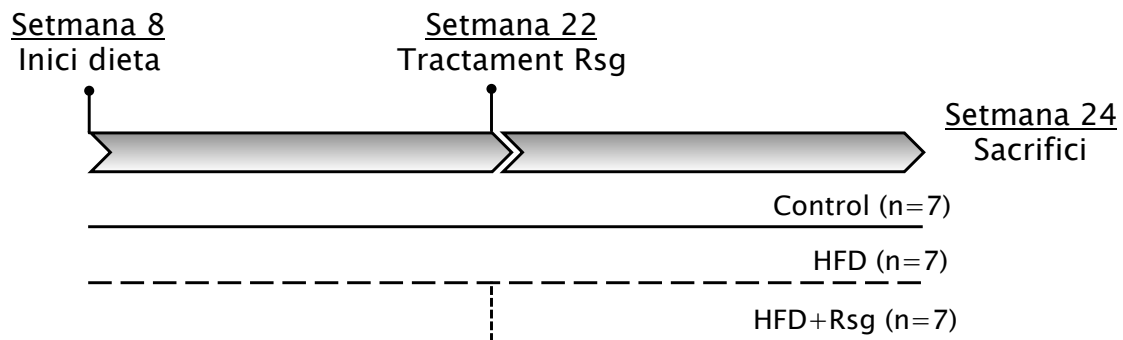


Figura 12. Fases del desenvolupament de l'estudi amb rates alimentades amb HFD i sotmeses a tractament farmacològic. S'obtingueren 12 grups formats per 7 animals cadascun: 6 grups tractats amb sèrum salí (control, HFD i HFD+Rsg; tant mascles com femelles) i 6 grups tractats amb insulina (control, HFD i HFD+Rsg; tant mascles com femelles). HFD, dieta hiperlipídica; Rsg, rosiglitazona.

3.1.2. Determinació de la tolerància a la glucosa

El test de tolerància a la glucosa avalua la capacitat del pàncrees per secretar insulina i la resposta dels altres teixits a aquesta hormona. S'analitza mesurant la glucèmia al llarg del temps després d'una sobrecàrrega de glucosa.

Aquesta prova es va dur a terme 4 dies abans del sacrifici a les rates alimentades amb HFD i sotmeses a tractament farmacològic. Els animals van ser dejunats durant 12h i se'ls hi va administrar glucosa per via intraperitoneal (2 g per kg de pes corporal). La glucèmia va ser mesurada abans de la injecció (temps 0) i als 15, 30, 60 i 120 min a través de la sang obtinguda de la punció de la vena safena mitjançant el sistema Accutrend® (Roche Diagnostics, Basilea, Suïssa). La corba de tolerància a la glucosa es va obtenir representant la glucèmia al llarg de les 2h de duració de la prova.

3.1.3. Sacrifici, obtenció i processament de mostres

En tots els estudis, les rates es van sacrificar per decapitació per evitar l'alteració del metabolisme provocat per l'ús d'anestèsics (Saha *et al.* 2005).

Es va recollir la sang del coll immediatament i es van determinar els nivells de TG i de glucosa usant un glucòmetre (Accutrend®, Roche Diagnostics). El fetge i altres teixits d'interès foren extrets ràpidament, rentats en sèrum salí i congelats a -80°C fins al seu ús posterior. La sang del coll es va mantenir 20 min a temperatura ambient per permetre la formació del coàgul. Després d'aquest temps es va centrifugar 20 min a 1000g i 4°C per obtenir el sèrum, el qual va ser aliquotat i emmagatzemat a -80°C per a les posteriors determinacions. Es van usar kits comercials tipus ELISA per mesurar els nivells sèrics d'adiponectina i leptina (Merck–Millipore, Billerica, Estats Units), d'insulina (Mercodia, Uppsala, Suècia), i d'E2 (DRG Instruments, Marburg, Alemanya). Per altra banda, es van usar kits colorimètrics per determinar els nivells sèrics de NEFAs (Wako Chemicals GmbH, Neuss, Alemanya) i de HDL colesterol, LDL colesterol i colesterol total (Spinreact, Girona, Espanya).

Per a la determinació dels nivells sèrics d'E2, i per tal d'incrementar la sensibilitat de la mesura, es va realitzar una concentració prèvia de la fracció orgànica del sèrum (Dighe & Sluss 2004). Per a fer-ho, 1 ml de sèrum es va diluir en 10 ml de solució hexà:acetat d'etil 3:2, que va permetre la formació de dues fases. La fase orgànica, que conté l'E2, es va recuperar després d'haver congelat la fase aquosa a -20°C durant 30 min. Per tal de maximitzar l'obtenció d'E2, i un cop retirada la fase orgànica, es va repetir el procediment. Després de la unió dels dos extractes se'n va obtenir un de sol, el qual es va assecar amb un flux de nitrogen i es va resuspendre en sèrum lliure d'esteroides (Charcoal FBS, Biological Industries, Beit–Haemek, Israel).

3.1.4. Determinació del lípids totals hepàtics

L'extracció del contingut total de lípids hepàtics es fonament en la seva separació emprant una mescla de dissolvents orgànics (Folch *et al.* 1957). Es van pesar i homogeneïtzar 0,5–1 g de fetge mitjançant un Potter–Elvehjem en una mescla de cloroform:metanol (2:1). L'homogenat obtingut es va filtrar dins uns tubs de Folch i s'afegiren 2 ml de NaCl 0,45% per eliminar impureses. Després d'agitar els tubs vigorosament i de deixar-los reposar a temperatura ambient, es van separar una fase inferior clorofòrmica, que conté dissolts els lípids, i una fase aquosa superior, amb metanol i impureses. A la fase clorofòrmica s'hi van afegir 10 ml de metanol pur a fi de restablir la proporció cloroform:metanol 2:1, i 2 ml de NaCl 0,9% per eliminar impureses. Després d'una nova agitació i separació de les fases, a la fase clorofòrmica se li afegiren 2 ml de NaCl 0,9% i novament es deixaren separar les fases. D'aquesta manera s'assegurà l'eliminació de totes les impureses de l'extracte lipídic, el qual s'enrasà fins als 10 ml amb cloroform:metanol 2:1. Dins uns vials estèrils i pesats prèviament a una balança de precisió, s'hi abocaren 4 ml de l'extracte lipídic i s'introduïren dins una estufa a 60°C un mínim de 24h, fins a l'evaporació completa del metanol i del cloroform per tal d'assegurar que al vial només hi quedessin restes de lípids. Aleshores, els vials es tornaren a pesar, i per diferència de pes amb els vials buits, es va calcular el pes dels lípids totals.

3.1.5. Determinació dels NEFAs hepàtics

Els NEFAs hepàtics es van determinar mitjançant un kit fluorimètric basat en la concentració prèvia de la fracció orgànica per tal d'augmentar el rendiment de la quantificació (Sigma–Aldrich). Uns 10 mg de fetge van ser homogeneïtzats mitjançant un dispersor tipus Polytron (T10 basic ULTRA–TURRAX, IKA–Werke GmbH, Staufen, Alemanya) en 400 µl de cloroform (Sigma–Aldrich) amb un 1% tritó X–100 (Sigma–Aldrich). Llavors es centrifugaren les mostres a 13000g i es

recollí la fase inferior orgànica, on s'hi trobaven dissolts els NEFAs. Després d'eliminar el cloroform a 50°C, es dissolgueren els lípids en 200 µl del tampó proporcionat pel kit. En una placa de 96 pouets, es van carregar 50 µl de mostra a una dilució 1/3 i a continuació els reactius subministrats pel kit per tal d'obtenir una senyal quantificable amb un lector de fluorimetria FLx800 (Bio-Tek, Winooski, Vermont, Estats Units), a una longitud d'ona d'excitació de 535 nm i d'emissió de 587 nm, proporcional als NEFAs presents a la mostra. La concentració de NEFA s'establí per extrapolació amb un calibrador intern d'àcid palmític.

3.1.6. Preparació dels homogenats hepàtics

Una petita porció de fetge va ser homogeneïtzada amb un dispersor tipus Polytron en una proporció de 0,1 g de teixit per 1 ml de tampó STE (sacarosa 250 mM, Tris 20 mM, KCl 40 mM, EDTA 2 mM, pH 7,4). L'homogenat va ser guardat a -20°C per a la posterior determinació de les activitats enzimàtiques, dels nivells de TG i colesterol, i de la capacitat antioxidant total (TAC). Una alíquota va ser, a més, tractada amb inhibidors de fosfatases (Na₃VO₄ 1 mM) i proteases (PMSF 1mM, pepstatina 10 µM, leupeptina 10 µM) per evitar la degradació de les proteïnes i realitzar els posteriors Western blots.

3.1.7. Determinació dels nivells de TG i colesterol hepàtics

Tant la concentració de TG com la de colesterol es van determinar de manera independent a partir dels homogenats hepàtics per colorimetria usant kits comercials (Spinreact). En cubetes de 1 ml de pas de llum es van pipetejar 10 µl a una dilució 1/2 i 10 µl directes dels homogenats de fetge per a la mesura dels TG i del colesterol, respectivament. Seguidament es van afegir els components subministrats pel kit i es va mesurar l'absorbància a 505 nm en un espectrofotòmetre UV-2100 (Shimadzu, Kyoto, Japó). Aquests kits es basen en l'obtenció, mitjançant una sèrie de reaccions concatenades, d'una quinona quantificable a

500–650 nm, la intensitat de la qual és proporcional a la concentració de TG o de colesterol present a la mostra. Les concentracions es van establir d'acord amb l'absorbància dels calibradors interns proporcionats pels kits.

3.1.8. Determinació de la TAC hepàtica

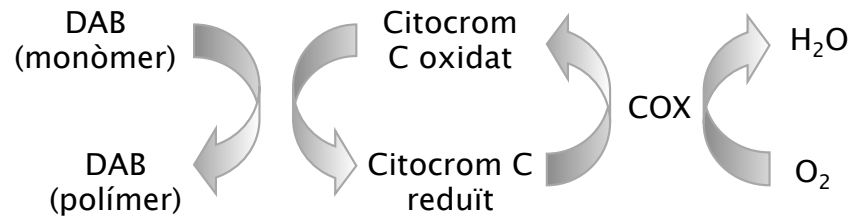
La TAC es va determinar a partir de l'homogenat de fetge mitjançant un kit colorimètric (BioVision Research products, San Francisco Bay Area, Califòrnia, Estats Units). El mètode es fonamenta en la reducció del Cu^{2+} a Cu^+ per part de mecanismes antioxidants no enzimàtics, compresos per petites molècules i proteïnes. L'ió Cu^+ és quelat mitjançant una prova colorimètrica i dóna una senyal detectable a 570 nm, proporcional a la TAC. Es va emprar Un estàndard de trolox (derivat sintètic de la vitamina E) va ser emprat per expressar la TAC de les mostres en forma d'equivalents de trolox.

3.1.9. Determinació d'activitats enzimàtiques

3.1.9.1. Activitat citocrom c oxidasa

La citocrom *c* oxidasa (COX) és el quart complex enzimàtic de la cadena de transport electrònic, situat a la membrana interna mitocondrial. En concret, catalitza la reducció irreversible de l'oxigen molecular a aigua a partir de 4 electrons provinents del citocrom *c* reduït.

Aquest mètode es basa en què el citocrom *c* oxidat pot tornar a reduir-se en una reacció acoblada a la formació d'un polímer de tetraclorur de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) detectable a 450 nm (Chrzanowska-Lightowlers *et al.* 1993). Per tant, l'aparició del polímer de DAB és directament proporcional a l'activitat de la COX.



El citocrom *c* reduït necessari es prepara a partir de la reducció del citocrom *c* oxidat mitjançant un procés de diàlisi. Dins un sac de diàlisi, prèviament bullit, 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 en un matràs kitasato que conté tampó fosfat 0,01 M i es manté a 4°C en agitació suau durant 24h protegit del llum. En aquestes condicions, el citocrom *c* és reduït per l'àcid ascòrbic, el qual escapa del sac. Durant el procés es canvia el tampó fosfat 0,01 M tres vegades per tal d'afavorir el moviment de l'àcid ascòrbic i eliminar-ne l'excés.

L'activitat de la COX es va mesurar en plaques de 96 pouets en un volum final de 200 µl. Les concentracions i els volums dels reactius i mostra que es carregaren a cada pouet foren els següents:

Tampó NaPO ₄ H ₂ 0,1 M, pH 7	135 µl
Catalasa 40 µg/ml en tampó NaPO ₄ H ₂	10 µl
Homogenat hepàtic	5 µl
DAB 50 mM	20 µl
Citocrom <i>c</i> reduït 807 µM	30 µl

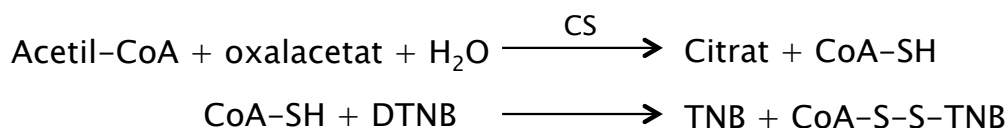
Es van afegir tots els components anteriors, llevat del citocrom *c* reduït, el qual es va incorporar ràpidament després d'agitar fortament la placa durant 30 segons.

Es desconeix el coeficient d'extinció molar del DAB reduït, per la qual cosa els càlculs es realitzaren a partir dels valors dels pendents blanquejats i els resultats s'expressaren en unitats arbitràries.

3.1.9.2. Activitat citrat sintasa

La citrat sintasa (CS) catalitza la primera reacció del cicle de Krebs a la matriu mitocondrial a partir de l'acetil-CoA i l'oxalacetat.

La detecció de l'activitat de la CS es basa en la hidròlisi del grup tioèster de l'acetil-CoA que origina un CoA unit a un grup tiol, el CoA-SH (Nakano *et al.* 2005). El grup tiol pot reaccionar amb l'àcid 5',5'-ditiobis 2-nitrobenzoic (DTNB) i formar àcid 5-tio 2-nitrobenzoic (TNB), compost directament proporcional a l'activitat de la CS i que es pot detectar a 412 nm.



L'activitat de la CS es va mesurar en plaques de 96 pouets en un volum final de 245 µl. Les concentracions i volums dels reactius i mostra que es carregaren a cada pouet van ser els següents:

Tris 0,16 M, pH 8	120 µl
Homogenat hepàtic dilució 1/80	16 µl
Acetil-CoA 0,25 mM	35 µl
DTNB 3,5 mM en Tris 0,16 M	4 µl
Tritó X-100 0,4%	35 µl
Oxalacetat 2,5 mM	35 µl

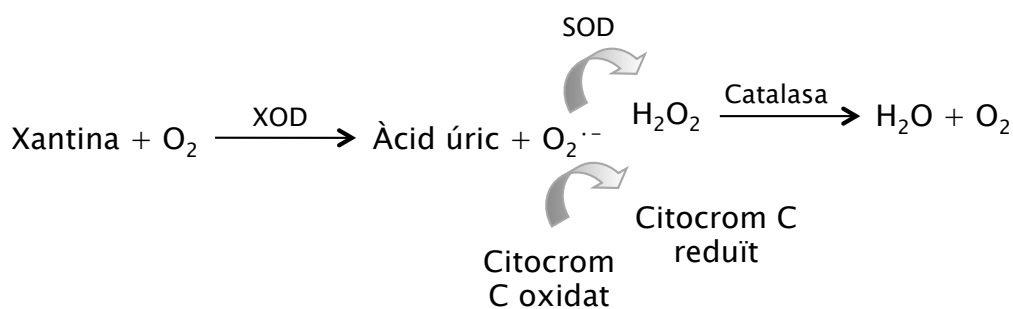
L'oxalacetat s'afegí en darrer lloc, després de la incubació a 30°C durant 3 min de la resta de components.

Els càlculs de l'activitat de la CS es realitzaren aplicant la llei de Beer-Lambert (coeficient d'extinció molar del TNB = 13,6 mM⁻¹cm⁻¹).

3.1.9.3. Activitat superòxid dismutasa

La superòxid dismutasa (SOD) constitueix la primera línia de defensa contra les ROS que es generen a la cadena de transport electrònic, ja que s'encarrega de dismutar l'aniò superòxid ($O_2^{\cdot-}$) en peròxid d'hidrogen (H_2O_2) i oxigen molecular.

La determinació de l'activitat SOD es basa en la capacitat del $O_2^{\cdot-}$ de reduir el citocrom *c*, mesurable espectrofotomètricament a 550 nm (Quick *et al.* 2000).



La reacció de la xantina oxidasa (XOD) dóna lloc a la formació de $O_2^{\cdot-}$, que pot reduir el citocrom *c*. No obstant, en presència de SOD, el $O_2^{\cdot-}$ és transformat a H_2O_2 , de manera que la reducció del citocrom *c* es veu disminuïda. Per tant, l'anàlisi de la reducció del citocrom *c*, és inversament proporcional a l'activitat SOD de la mostra.

L'activitat SOD es va mesurar en plaques de 96 pouets en un volum final de 250 μl . Les concentracions i volums dels reactius i mostra que es carregaren a cada pouet foren els següents:

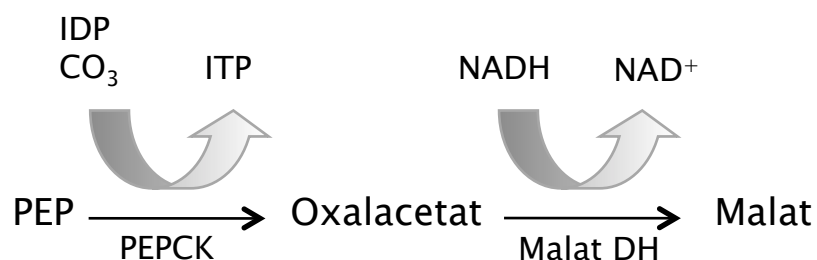
Tampó fosfat salí (PBS), pH 7,4	225 μl
Citocrom <i>c</i> 1,95 mM en PBS	6 μl
XOD 335 U/ml en NaOH 30 mM	9 μl
Xantina 10 mM en PBS	2,5 μl
Catalasa 6000 U/ml en PBS	2,5 μl
Homogenat hepàtic dilució 1/8	5 μl

S'utilitzà un control 1, sense mostra ni SOD, corresponent a la màxima reducció del citocrom c per part del $O_2^{\cdot-}$, de manera que les pendents problema es restaren d'aquest pendent. També s'utilitzà un control 2 amb una alta concentració de SOD (570 U/ml) enlloc de mostra. La funció del control 2 és actuar com a control de qualitat del mètode, ja que al haver-hi molta SOD, poc citocrom c és reduït per part del $O_2^{\cdot-}$ (pendent mínima).

Els càlculs de l'activitat SOD es feren aplicant la llei de Beer-Lambert (coeficient d'extinció molar del citocrom c reduït = $21 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

3.1.9.4. Activitat fosfoenolpiruvat carboxicinasasa

La fosfoenolpiruvat carboxicinasasa (PEPCK) és un enzim clau de la gluconeogènesi, encarregat de la conversió de l'oxalacetat a fosfoenolpiruvat (PEP), en un procés que utilitza trifosfat d'inosina (ITP) com a font d'energia. L'anàlisi de la seva activitat és basa en l'estudi de la reacció inversa, acoblada a la reacció catalitzada per l'enzim malat deshidrogenasa (malat DH) afegida exògenament (Opie & Newsholme 1967).



L'activitat de la PEPCK es determina a partir de la desaparició del NADH a 340 nm degut a la conversió de l'oxalacetat a malat.

Aquesta activitat es va mesurar en cubetes d'espectrofotòmetre en un volum final de 1010 μl . Les concentracions i volums dels reactius i mostra usats van ser els següents:

Tampó:	860 µl
Tris 36 mM, pH 7,4	
MgCl ₂ 1,18 mM	
NaCO ₃ H 17,85 mM	
Glutatió reduït 110 mM	10 µl
NADH 14 mM	10 µl
Difosfat d'inosina (IDP) 118 mM	10 µl
Malat DH 600 U/ml	30 µl
Homogenat hepàtic dilució 1/2	30 µl
PEP 16,5 mM	60 µl

Els càlculs de l'activitat de l'activitat PEPCCK es feren aplicant la llei de Beer-Lambert (coeficient d'extinció molar del NADH = 6,22 mM⁻¹cm⁻¹).

3.2. Metodologia *in vitro*

3.2.1. Estudis amb hepatòcits HepG2

Els estudis *in vitro* de la present tesi doctoral es van dur a terme amb hepatòcits HepG2 (American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, Estats Units), una línia cel·lular perpètua consistent en cèl·lules carcinomatoses de fetge provinents del teixit hepàtic d'un home caucàsic de 15 anys. Es tracta de cèl·lules adherents amb morfologia epitelial (fig. 13).

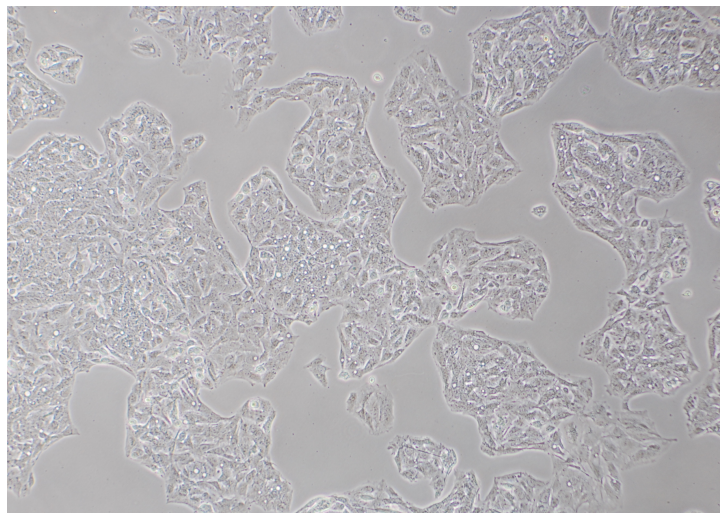


Figura 13. Imatge al microscopi (augment 100X) de les cèl·lules HepG2.

Els hepatòcits HepG2 estan altament diferenciats i mostren moltes de les característiques genotípiques de les cèl·lules normals del fetge (Javitt 1990; Hoekstra & Chamuleau 2002; Gonzales *et al.* 2015). Aquest fet, juntament amb l'elevada disponibilitat d'aquestes cèl·lules degut a la seva immortalitat, les han convertit en un model vàlid àmpliament usat en diversos estudis, com l'esteatosi o el metabolisme hepàtic (Javitt 1990; Gómez-Lechón *et al.* 2007), entre d'altres.

3.2.2. Procediments generals de cultius

3.2.2.1. Manteniment i subcultiu

Els hepatòcits HepG2 es van mantenir rutinàriament en plaques p100 (amb una superfície de creixement aproximada de 55 cm²), a 37°C en una atmosfera humida amb un 5% de CO₂. El medi de cultiu emprat fou Medi Essencial Mínim (MEM, Biowest, Nuaille, França) amb 5,6 mM de glucosa, completat amb un 10% de sèrum fetal boví (FBS) i un 1% de penicil·lina–estreptomicina (Biological Industries, Beit–Haemek, Israel). La suplementació amb FBS suposa l'aportació dels factors de creixement, hormones, minerals, lípids i altres micronutrients requerits per a la correcta proliferació i adhesió cel·lular. El volum de medi complet emprat a les plaques p100 era d'uns 12 ml, i es renovava un mínim de dos pics per setmana. Totes les solucions emprades a cultius es temperaven en un bany a 37°C abans d'usar-les sobre les cèl·lules per tal d'evitar un possible xoc tèrmic. El material i solucions emprats s'adquiriren estèrils o s'esterilitzaren mitjançant diferents mètodes, com l'ús de l'autoclau, la irradiació ultraviolada o l'ús de filtres de 0,22 µm de diàmetre de porus.

Abans d'arribar a la confluència es van realitzar subcultius a noves plaques per tal d'assegurar la integritat i continuïtat del cultiu cel·lular. Per a tal fi, el medi de cultiu es va descartar i es van fer dos rentats amb tampó PBS. Aquests rentats són necessaris pel correcte funcionament de la solució tripsina–EDTA, l'activitat de la qual pot veure's inhibida per restes de FBS. Llavors, s'afegiren 2 ml de tripsina 0,25% – EDTA 0,02% (Sigma–Aldrich) i s'incubà la placa a 37°C durant uns sis min amb la finalitat de rompre les unions proteiques que s'estableixen entre les cèl·lules i el fons tractat de la placa. Com a resultat, les cèl·lules quedaren en suspensió i s'inactivà la solució tripsina–EDTA afegint medi complet un mínim de 3 vegades el volum de tripsina usat. El rati de subcultiu recomanat per a les HepG2 és de 1:4 a 1:6. Els subcultius també es realitzaven cada vegada que s'havia de realitzar un

experiment, pel qual s'usaven plaques amb una superfície de creixement inferior al de les p100. En aquests casos es realitzava sempre un comptatge previ a la sembra a les noves plaques utilitzant una càmera de Neubauer. Pel comptatge de cèl·lules viables es va usar un colorant vital (Trypan Blue, Sigma-Aldrich) i s'aplicà la següent fórmula:

$$\text{Concentració (cel/ml)} = \text{nombre de cèl·lules} / [\text{volum (ml) del requadre} \\ \text{on s'ha realitzat el comptatge} * \text{Factor de dilució}]$$

Tenint en compte que el volum del requadre on es realitzaren els comptatges era de 0,0001 ml, i que s'aplicà una dilució 1:2 (0,5), la fórmula final que s'aplicà fou la següent:

$$\text{Concentració (cel/ml)} = \text{nombre de cèl·lules} \times 2 \times 10^4$$

3.2.2.2. Congelació i descongelació

Per tal de generar un estoc de cèl·lules per utilitzar en el moment adequat, aquestes havien de ser congelades en una atmosfera de nitrogen i descongelades segons les necessitats. D'aquesta manera s'evita un excés del nombre de subdivisions, que a la llarga comportaria la pèrdua d'algunes característiques cel·lulars. Per això, les cèl·lules s'usaven amb un nombre baix de divisions, sempre per davall dels 15 subcultius.

Pel procés de congelació es va procedir de la mateixa manera que pel subcultiu. Un cop les cèl·lules estaven resuspeses en tripsina-EDTA i medi, s'abocà el contingut dins un tub i es va centrifugar a 130g durant 5 min per tal que el contingut cel·lular precipités. El precipitat es va resuspendre en 1 ml de medi complet amb un 5% de dimetilsulfòxid (DMSO), un crioprotector cel·lular, i es va traspasar a un vial de congelació. Abans d'emmagatzemar els vials en una atmosfera de nitrogen, s'utilitzà el sistema Mr. Frosty™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estats Units) per evitar la congelació dràstica

de les cèl·lules. Aquest contenidor d'isopropanol es va mantenir a -80°C un mínim de 3h per tal de permetre que la temperatura baixés 1°C per minut, velocitat de congelació òptima per a la conservació de les cèl·lules.

Per a la descongelació dels hepatòcits HepG2, els vials es descongelaren ràpidament durant uns dos min en el bany termostatitzat i el volum es va traspasar a un nou tub estèril que contenia 9 ml de medi complet. Aquests tubs es centrifugaren a 130g durant 5 min per tal d'obtenir un precipitat cel·lular net de la toxicitat del DMSO. Aquest precipitat es va resuspendre en 12 ml de medi complet i es va sembrar a una nova placa p100.

3.2.2.3. Anàlisi de la contaminació dels cultius cel·lulars

Els micoplasmes són petits bacteris del grup dels *Mollicutes* que constitueixen els principals contaminants dels cultius cel·lulars. Tot i que pràcticament imperceptibles, els micoplasmes causen greus efectes sobre les cèl·lules eucariotes, alterant l'expressió normal de gens i el creixement cel·lular. 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 un anàlisi específic.

El micoplasma degrada els components del medi cel·lular, donant lloc a productes metabòlics específics que informen de la presència de micoplasma. Basat en aquest principi, s'utilitzà un mètode colorimètric visual per a la detecció rutinària de micoplasma (Biotools, Houston, Texas, Estats Units), en el qual les mostres contaminades adquireixen una coloració fosca, com la del control positiu.

3.2.3. Tractaments

Les cèl·lules HepG2, adequadament sembrades en diferents tipus de plaques, van ser sotmeses a una sèrie de tractaments, detallats a continuació (taula 2). Per evitar interferències amb l'E2, es van incubar els hepatòcits 24h abans dels respectius tractaments amb medi MEM sense roig fenol (Biological Industries) per tal d'eliminar la capacitat estrogènica del roig fenol. A més, al medi se li afegí un 10% de FBS desproveït d'esteroides (Charcoal FBS, Biological Industries).

Taula 2. Tractaments aplicats als hepatòcits HepG2.

Compost	Concentració	Temps	Vehicle
<i>Efectes dels estrògens sobre la funció i la biogènesi mitocondrials del fetge. Implicació dels PGCs</i>			
E2	10 nM	40h	Etanol
siPGC-1 α /siPGC-1 β	20 nM	24h	H ₂ O
<i>Paper de l'AMPK com a intermediari en les accions de l'E2 sobre el metabolisme lipídic hepàtic</i>			
E2	100 nM	24h	Etanol
Palmitat	0,75 mM	24h	BSA i NaOH
Compost C	10 μ M	1h + 24h	H ₂ O
<i>Implicació de l'E2 en la resistència hepàtica a la insulina en un entorn lipotòxic. Relació amb la funció i la biogènesi mitocondrials</i>			
E2	100 nM	24h	Etanol
Palmitat	0,75 mM	24h	BSA i NaOH
Insulina	10 nM	15 min	Aigua acidificada, pH 2-3

3.2.3.1. Silenciament de l'expressió gènica

L'expressió d'un determinat gen es pot silenciar mitjançant l'ús d'un RNA d'interferència (RNAi, de l'anglès *RNA interference*), procés que es basa en el reconeixement de seqüències específiques del mRNA per petites molècules de RNA. Aquesta unió implica l'alteració en la

traducció del mRNA a proteïna (fig. 14). Entre els diferents tipus de RNAi, destaquen els petits RNA d'interferència (siRNA, de l'anglès *small interfering RNA*), que són petites molècules de doble hèlix amb una longitud compresa entre 19 i 25 nucleòtids. Els siRNA són introduïts exògenament a la cèl·lula mitjançant un procés anomenat transfecció. Aquest procés pot ser assolit mitjançant l'ús de liposomes catiónics, que permeten la formació de complexos amb el siRNA i la seva posterior entrada a la cèl·lula evitant les repulsions electrostàtiques. Un cop dins, les molècules de siRNA passen a formar part del complex de silenciament induït per RNA (RISC, de l'anglès *RNA-induced silencing complex*). Aquest complex separa les dues cadenes del siRNA i una d'elles s'hi queda associada de forma estable. Aquesta cadena de siRNA interacciona de forma específica amb la seqüència diana del mRNA, de manera que s'afavoreix que el complex RISC degradi el mRNA o bé que interfereixi en la unió del ribosoma, impedit així la traducció.

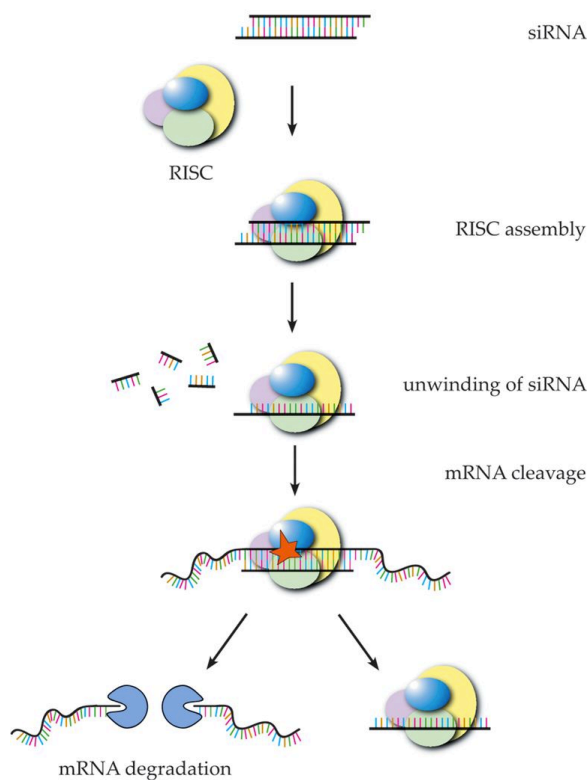


Figura 14. Mecanisme d'acció dels siRNA. RISC, complex de silenciament induït per RNA. (Modificat de Cejka *et al.* 2005).

Una de les passes crítiques del procés de silenciament és la transfecció, de manera que s'han d'ajustar molt bé les condicions usades. Les cèl·lules HepG2 constitueixen una línia difícil de transfectar, per la qual cosa es recomana realitzar una transfecció reversa. Aquest procés, a diferència de la transfecció tradicional, implica que la transfecció i la sembra de cèl·lules es realitzen al mateix temps. D'aquesta manera s'incrementa la superfície d'entrada dels complexos formats pels liposomes i els siRNA a les cèl·lules, augmentat així l'eficiència del procés de transfecció.

Els experiments de silenciament de la present tesi es van dur a terme en plaques de 12 pouets, on cada pouet té una superfície de creixement aproximada de 3,8 cm². Es van usar siRNA humans contra PGC-1 α o PGC-1 β , i també un siRNA control (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, Estats Units). Com a reactiu de transfecció es va emprar Lipofectamina RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific). Cada siRNA va ser diluït en medi reduït de sèrum (Opti-MEM, Thermo Fischer Scientific) per tal que la concentració final de cada siRNA al pouet fos de 20 nM. Seguint les recomanacions del producte, es va afegir el volum pertinent de Lipofectamina RNAiMAX. Aquesta mescla es va mantenir 20 min a temperatura ambient per permetre la formació dels complexos entre els liposomes i els siRNA (mix de transfecció). Durant aquest temps, es van resuspendre cèl·lules HepG2 en medi MEM complet sense roig fenol i lliure d'antibiòtics, ja que s'ha vist que aquests darrers causen mort cel·lular durant el procés de silenciament. Després dels 20 min, i sobre la mix de transfecció, es va afegir el volum corresponent de cèl·lules HepG2 per tal que la confluència fos al voltant del 50% passades 24h. 24h després, la mix de transfecció es va eliminar i les cèl·lules es van tractar amb E2 durant 40h més.

3.2.3.2. Preparació del palmitat

Per a la preparació del palmitat (PA), cal conjuguar-lo amb albúmina sèrica bovina (BSA) per assegurar la seva solubilitat en fase aquosa.

L'àcid palmític es va dissoldre en NaOH 0,1 N a 70°C durant 15 min, de manera que es va formar PA sòdic per reacció de saponificació. El PA es va dissoldre en MEM sense roig fenol i amb BSA lliure d'àcids grassos a 37°C durant 30 min. Com a resultat, es va obtenir una solució amb una concentració final de PA de 5 mM amb un rati PA:BSA de 4:1. Les solucions de PA i les de vehicle (NaOH i BSA) es van filtrar i emmagatzemar a -20°C.

3.2.4. Determinació dels nivells intracel·lulars de lípids

El colorant Oil Red O (Sigma-Aldrich) tenyeix els lípids neutres intracel·lulars no associats a membrana, de manera que aquests prenen una coloració vermella fàcilment observable al microscopi, senyal que també es pot quantificar espectrofotomètricament. Aquesta tinció s'ha usat com a mètode per detectar i quantificar l'esteatosi hepàtica tant a biòpsies de rosegadors, d'humans o en hepatòcits HepG2 (Cui *et al.* 2010; Catta-Preta *et al.* 2011; Levene *et al.* 2012).

Aquest experiment es va realitzar en plaques de 12 pouets. Les cèl·lules van ser fixades durant 1 hora a temperatura ambient amb formalina al 10% i tenyides amb solució de treball d'Oil Red O. Després de varis rentats amb aigua per eliminar l'excés del colorant, es van observar els lípids al microscopi (Nikon, Tòquio, Japó) i es van fer fotografies amb una càmera Nikon D80. Posteriorment, l'aigua fou completament eliminada dels pouets i s'eluí el colorant amb 500 µl d'isopropanol 100%. Finalment, es va llegir l'absorbància a 500 nm.

L'estoc d'Oil Red O és estable 1 any i es prepara pesant 0,35 g del colorant en 100 ml d'isopropanol i deixant agitar tota la nit. La solució de treball és estable 2h i es prepara mesclant 6 ml de l'estoc amb 4 ml d'aigua bidestil·lada. Després d'un repòs de 20 min, la solució de treball es passa per un filtre de 0,45 µm de diàmetre de porus.

3.2.5. Recollida de proteïnes per a Western blot

3.2.5.1. TriPure Isolation Reagent®

Per estudiar els efectes de l'E2 sobre la funció i la biogènesi mitocondrials, les proteïnes es van extreure mitjançant el reactiu TriPure Isolation Reagent® (Roche Diagnostics), que permet la separació del RNA, DNA i proteïnes de mostres cel·lulars o tissulars mitjançant una extracció amb fenol:cloroform. Cal tenir en compte que aquest reactiu conté els agents tòxics fenol i tiocianat de guanidina, per la qual cosa cal treballar en una campana d'extracció de gasos i emprar totes les mesures de seguretat necessàries.

En el cas de les cèl·lules HepG2, s'afegiren 400 µl o 1 ml del reactiu directament sobre el pouet, segons si es treballà amb plaques de 12 o de 6 pouets, respectivament. Després de traspasar el volum a un tub, s'afegí cloroform i es va realitzar una centrifugació a 14000g a 4°C durant 15 min. D'aquesta manera es van obtenir 3 fases en funció de la solubilitat: una fase superior aquosa incolora que conté el RNA (veure apartat 3.3.6.), una interfície blanca, i una fase inferior orgànica rosada amb el DNA i les proteïnes (veure apartat 3.3.5. per extracció del DNA).

Un cop separada la fase inferior orgànica, es va fer precipitar el DNA afegint etanol absolut, de manera que les proteïnes van romandre al sobrenedant dissoltes en fenol i etanol. Després de la separació d'aquest sobrenedant a un nou tub, es van precipitar les proteïnes amb isopropanol i una posterior centrifugació a 12000g a 4°C durant 5 min. El pellet proteic es va rentar un total de 3 vegades amb hidrocloreur de guanidina 0,3 M en 95% d'etanol i novament es van fer precipitar les proteïnes emprant aquesta vegada etanol absolut. Els pellet proteics es van dissoldre en dodecilsulfat sòdic (SDS) 1% a 50°C durant el temps necessari.

3.2.5.2. RIPA

Pels estudis dels efectes de l'E2 en condicions lipotòxiques, les proteïnes es van extreure mitjançant l'ús del tampó RIPA. Aquest mètode permet la lisi i solubilització de les proteïnes, alhora que evita la seva degradació i desfosforilació mitjançant la presència d'inhibidors de proteases i fosfatases. La seva composició és la següent: Tris 50 mM pH 7,5, tritó X-100 1%, deoxicolat sòdic 0,5%, SDS 0,1%, EDTA 1 mM, NaCl 150 mM, PMSF 1 mM, pepstatina 10 µM, leupeptina 10 µM, NaF 1 mM i Na₃VO₄ 0,2 mM.

Abans de recollir les cèl·lules, es va fer un rentat amb PBS per eliminar les restes de medi. Llavors s'afegí tampó fred RIPA i, mitjançant l'ajuda de raspadors cel·lulars, es van obtenir els lisats cel·lulars. Tot seguit es va realitzar una centrifugació a 14000g durant 10 min a 4°C i es descartà el precipitat (restes cel·lulars).

3.2.6. Anàlisi de la viabilitat cel·lular

Els diferents tractaments realitzats poden causar citotoxicitat i mort cel·lular, per la qual cosa les cèl·lules poden perdre la seva capacitat d'adhesió i desenganxar-se del fons de la placa. El cristall violeta és una mesura útil per determinar la viabilitat cel·lular (Nagamine *et al.* 2009), ja que aquest colorant s'uneix al DNA de manera proporcional al nombre de cèl·lules.

L'assaig es realitzà en plaques de 96 pouets, amb una superfície de creixement aproximada de 0,32 cm² per pouet. Les cèl·lules es van tenyir amb cristall violeta 0,5% (p/v) en 30% d'àcid acètic durant 10 min a temperatura ambient. La funció de l'acètic és la fixació de les cèl·lules. L'excés de colorant es va eliminar mitjançant varis rentats amb aigua bidestil·lada. Finalment, el cristall violeta es va solubilitzar amb 100 µl de metanol i es va llegir l'absorbància a 570 nm.

3.2.7. Determinació de la massa mitocondrial

La massa mitocondrial es pot determinar a través de la fluorescència del compost 10-N-Nonil taronja d'acidilina (NAO), el qual s'uneix específicament a la cardiolipina de manera independent al potencial de membrana mitocondrial (Petit *et al.* 1992). La cardiolipina és un fosfolípid que es troba exclusivament a la membrana interna mitocondrial.

La mesura es realitzà en plaques de 96 pouets. El medi es canvià per una solució de PBS-glucosa 20 nM amb NAO 0,5 μ M. Després d'incubar la placa en obscuritat durant 30 min, es va procedir a la lectura de la fluorescència (λ d'excitació = 485 nm; λ d'emissió = 528 nm). Els valors es van referenciar al nombre de cèl·lules viables, obtingut mitjançant la tinció amb cristall violeta.

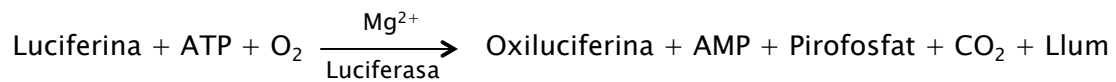
3.2.8. Determinació del potencial de membrana mitocondrial

El potencial de membrana mitocondrial (MMP) es pot determinar mitjançant l'ús de la tetrametilrodamina metil èster (TMRM), un fluoròfor catiònic lipofílic que s'acumula als mitocondris d'acord al seu potencial de membrana (Scaduto & Grotyohann 1999).

Les cèl·lules es van sembrar en plaques de 96 pouets. En el moment de la determinació el medi es reemplaçà per medi fresc amb TMRM 0,5 μ M. Després d'una incubació de 15 min en obscuritat, la solució es va canviar per medi fresc i es realitzà una nova incubació de 10 min. Llavors, el medi va ser retirat, es va fer un rentat amb PBS i es llegí la fluorescència en PBS (λ d'excitació = 552 nm; λ d'emissió = 576 nm). Els valors es referenciaren al nombre de cèl·lules viables, determinat mitjançant la tinció amb cristall violeta.

3.2.9. Determinació del contingut d'ATP

El contingut d'ATP es va determinar mitjançant un kit bioluminescent comercial (BioVision). L'assaig utilitza l'enzim luciferasa per catalitzar la formació de llum a partir d'ATP i luciferina.



La mesura es realitzà en plaques de 96 pouets. Es va eliminar el medi de cultiu de cada pouet i s'afegiren 100 µl del tampó proporcionat pel kit per lisar les cèl·lules. Després de 5 min agitant-se, es tractaren les cèl·lules amb luciferasa i es monitoritzaren els nivells d'ATP en un luminòmetre FLx800 (Bio-Tek).

3.2.10. Determinació dels nivells de ROS

El mètode de la 2',7'-diclorofluoresceïna diacetat (DCFH-DA) va ser usat per determinar els nivells de ROS (Wang & Joseph 1999). La DCFH-DA és un compost no polar que ràpidament difon dins les cèl·lules, on és hidrolitzat per les esterases intracel·lulars al derivat no fluorescent DCFH. Aquest compost queda atrapat dins les cèl·lules i és oxidat pels radicals intracel·lulars a 2',7'-diclorofluoresceïna, altament fluorescent. Així, la fluorescència emesa és directament proporcional al contingut de ROS.

Per a la determinació dels nivells de ROS es van sembrar les cèl·lules en plaques de 96 pouets. El dia de la prova, i després d'haver realitzat els tractaments pertinents, es canvià el medi per una solució de PBS-glucosa 20 nM amb DCFH-DA 10 µM. Després d'una incubació de 45 min en obscuritat, es va mesurar la fluorescència (λ d'excitació = 485 nm; λ d'emissió = 530 nm). Els valors es referenciaren al nombre de cèl·lules viables, obtingut mitjançant la tinció amb cristall violeta.

3.3. Metodologia general

3.3.1. Determinació de la concentració de proteïnes

3.3.1.1. Mètode de Bradford

La concentració proteica de l'homogenat de fetge de rata es va determinar mitjançant el mètode de Bradford (Bradford 1976). El principi d'aquest assaig és la interacció del colorant blau de Coomassie G-250 amb les proteïnes en un medi àcid, amb el conseqüent canvi d'absorbància de 465 a 595 nm.

Aquest mètode es va realitzar en plaques de 96 pouets. A cada un d'ells se li van afegir 10 µl d'homogenat de fetge de rata a una dilució 1/60, i 290 µl de reactiu de Bradford. El reactiu de Bradford es prepara mesclant blau de Coomassie G-250 amb etanol 96% i àcid fosfòric 85%. Paral·lelament, es va realitzar una recta patró amb concentracions conegudes de BSA (de fins a 500 µg/ml), de manera que es va poder extrapolar la concentració de les mostres problemes. Finalment, es va agitar la placa i es va fer una lectura a 595 nm.

3.3.1.2. Mètode de l'àcid bicinconinic

El reactiu de Bradford interfereix amb un elevat nombre de substàncies, de manera que en alguns casos no constitueix una mesura fiable de la concentració de proteïnes. Els detergents presents al tampó RIPA són incompatibles amb el reactiu de Bradford, per la qual cosa es va usar el mètode de l'àcid bicinconinic (BCA) per a la determinació de la concentració proteica dels lisats cel·lulars obtinguts amb RIPA (veure apartat 3.2.5.2.).

El mètode es basa en què les proteïnes, en un medi alcalí, redueixen ions cúprics a ions cuprosos. Llavors el BCA forma un complex soluble amb el catió cuprós, que pot ser detectat a 562 nm, d'una manera proporcional a la quantitat de proteïna de la mostra.

L'assaig es realitzà en plaques de 96 pouets amb un kit comercial (Thermo Fisher Scientific). Es van pipetejar 9 µl a dilució 1/3 de cada lisat cel·lular i 260 µl del reactiu proporcionat pel kit. Es van emprar solucions de BSA amb un rang de concentracions conegudes (de fins a 2000 µg/ml) per tal d'obtenir una recta patró, de manera que per extrapolació es va conèixer la concentració de proteïna present a la mostra.

3.3.1.3. Quantificació per absorbància a 280 nm

La concentració proteica dels lisats cel·lulars extrets mitjançant el TriPure Reagent Isolation® (veure apartat 3.2.5.1.) es va realitzar emprant el programa Gene5 Take3 en un espectrofotòmetre Powerwave XS (Bio-Tek). La purificació de les proteïnes mitjançant aquest mètode permet la quantificació de la seva concentració a partir de la mesura d'absorbància a 280 nm.

3.3.2. Western blot

La tècnica del Western blot permet la quantificació relativa dels nivells de proteïna d'un homogenat o lisat cel·lular. Es basa en la separació de les proteïnes segons el seu pes molecular mitjançant una electroforesi en gel de poliacrilamida en condicions desnaturalitzants (SDS-PAGE). A continuació es transfereixen les proteïnes a una membrana de nitrocel·lulosa, on són finalment detectades amb l'ús d'anticossos específics.

Preparació de les mostres

Tenint en compte la concentració de proteïnes de la mostra (veure apartat 3.3.1.), es va preparar en un tub el volum de mostra necessari per a carregar la quantitat de proteïna adequada. Aquesta quantitat depèn de varis factors, com de l'especificitat dels anticossos o de l'abundància de la proteïna en la mostra analitzada. A cada volum de

mostra se li afegí tampó de càrrega mantenint una relació mostra:tampó 3:1. Aquest tampó, preparat en Tris 0,25 M pH 6,8, conté glicerol 40% (v/v) per ajudar a la mostra a depositar-se al fons del pouet, el colorant blau de bromofenol 0,1% (p/v) per seguir el desplaçament de la mostra, i el detergent SDS 10% per rompre l'estructura terciària de les proteïnes i donar-lis càrrega negativa de forma uniforme. D'aquesta manera, la càrrega de les proteïnes és proporcional al seu pes molecular. Finalment, també s'afegeix β -mercaptoetanol 2,5%, que s'encarrega de rompre els ponts disulfur que uneixen les proteïnes multimèriques. A més, es van bullir les mostres durant 5 min abans de carregar-les al gel per tal de desnaturalitzar les proteïnes i facilitar la unió del SDS.

Electroforesi SDS-PAGE

L'electroforesi es du a terme combinant dos gels de poliacrilamida amb diferent pH entre ells, immersos en tampó d'electroforesi (Tris 0,025 M pH 8,3, glicina 0,192 M, SDS 0,1%). Els gels de poliacrilamida es formen per polimerització de monòmers d'acrilamida amb N,N'-metil bisacrilamida en presència de l'iniciador TEMED (0,001%) i del catalitzador persulfat d'amoni (0,11%) en tampó Tris (0,125 mM pH 6,8 al gel concentrador i 0,375 mM pH 8,8 al separador). El gel superior, anomenat concentrador, es prepara amb un 5% d'acrilamida/bisacrilamida. En cavi, el gel inferior, anomenat separador, varia quant al percentatge d'acrilamida/bisacrilamida en funció de la proteïna que es desitja separar. Com més elevada és aquesta concentració, més densa és la xarxa de poliacrilamida que es forma i per tant millor és la discriminació entre molècules de baix pes molecular, i a la inversa.

Quan s'aplica corrent elèctric, les proteïnes al gel concentrador migren amb una mobilitat electroforètica intermèdia entre els ions Cl^- i els de glicina. D'aquesta manera, el front d'ions de glicina premsen les proteïnes, que es concentren formant fines bandes. Quan els polielectròlits arriben al gel separador, les molècules de glicina migren

més ràpidament que les proteïnes, les quals es desplacen a una velocitat inversament proporcional al seu pes molecular.

Les electroforesis dutes a terme als experiments de la present tesi doctoral es van realitzar a un voltatge de 80 V durant uns 10 min, fins a l'entrada de la mostra al gel concentrador. Posteriorment, es va pujar el voltatge a 100 V unes 2h, controlant sempre el front de mobilitat gràcies al blau de bromofenol.

Transferència i bloqueig

Seguidament, les proteïnes es van transferir del gel a una membrana de nitrocel·lulosa per tal de permetre la seva posterior detecció. Així, es van realitzar uns muntatges en forma de casset que contenien, de baix a dalt: esponja, cartró, 3 papers Wathman, gel, membrana, 3 papers Wathman i esponja. El casset es col·loca de manera que el gel quedi més proper al càtode i la membrana a l'ànode. Aquest muntatge es troba immers en tampó de transferència (Tris 0,025 M pH 8,3, glicina 0,192 M, metanol 20%), constituint un sistema de transferència humida.

Les transferències es van realitzar a 100 V durant 1h i 30 min en fred per tal d'evitar el sobreescalfament del sistema.

Com a control de l'eficàcia de la transferència, i un cop aquesta havia finalitzat, es realitzava rutinàriament la tinció de les membranes amb Ponceau S 0,2% (p/v) en àcid acètic 3%. Aquest colorant s'uneix específicament a les proteïnes, de manera que s'obté un codi de bandes amb una coloració vermellosa. La tinció s'elimina fàcilment a través de varis rentats amb tampó Tris-salí (TBS, Tris 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5) amb Tween-20 0,5 g/l (TBS-T).

Seguidament, i amb l'objectiu de disminuir les unions inespecífiques dels anticossos, es va bloquejar la membrana amb TBS-T amb llet desnatada en pols 5% o amb BSA 5% durant 1h en agitació.

Detecció de les proteïnes específiques

Després de tres rentats amb TBS-T, la membrana es va incubar amb l'anticòs específic contra la proteïna desitjada a 4°C en agitació durant tota la nit. L'anticòs primari es prepara en una solució de TBS-T amb BSA 5% i acida sòdica 0,05%. Els anticossos i les dilucions emprades en aquesta tesi doctoral apareixen detallats a la taula 3. Després de retirar l'anticòs primari, es van incubar novament les membranes amb un anticòs secundari durant 1h en agitació a temperatura ambient. Aquest anticòs secundari, que reconeix el primari, es prepara amb TBS-T amb llet desnatada en pols 1% a una concentració variable entre 1:10000 i 1:50000. Per a permetre la detecció de les proteïnes específiques, aquest anticòs està conjugant a l'enzim peroxidasa de rave, de manera que en presència de peròxid d'hidrogen oxida el luminol i produeix una senyal quimioluminiscent detectable (fig. 15).

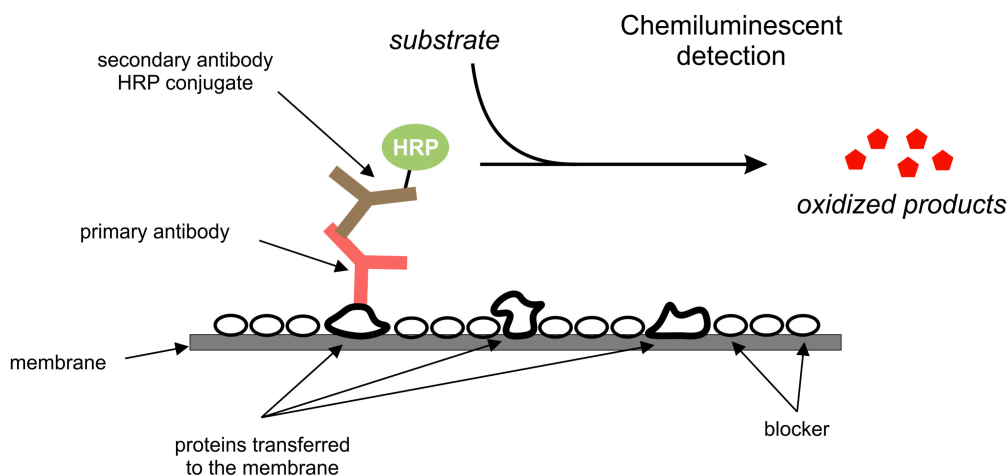


Figura 15. Sistema de detecció quimioluminiscent de les proteïnes. HRP, peroxidasa de rave. Modificat de Advansta, Inc.

La detecció de les bandes es va realitzar amb un kit comercial (Clarity Western ECL Substrate, Bio-Rad) usant el captador Chemidoc XRS (Bio-Rad) i el programa Quantity One 1-D Analysis. La proteïna d'interès era identificada pel seu pes gràcies a l'ús d'un marcador de pes molecular comercial (Precision Plus Protein Dual Color Standard, Bio-Rad).

Taula 3. Anticossos emprats per realitzar els Western blots.

Proteïna	Casa comercial	Espècie on s'ha usat	Pes molecular (kDa)	Dilució
AdipoR2	Santa Cruz	R	44	1:500
pAkt	Cell Signaling	R, H	60	1:1000
Akt	Cell Signaling	R, H	60	1:1000
pAMPK	Santa Cruz	R, H	63	1:500
AMPK	Santa Cruz	R, H	63	1:500
APPL1	Cell Signaling	R, H	82	1:1000
ATPasa	Abcam	R	53	1:1000
ATPasa	Santa Cruz	H	53	1:1000
Catalasa	Merck-Millipore	H	60	1:1000
COX I	Abcam	R	37	1:1000
COX IV	Abcam	H, R	16	1:1000
DNP	Cell Biolabs	R	-	1:2000
GAPDH	Santa Cruz	R, H	37	1:1000
HNE	Santa Cruz	R	-	1:1000
pJNK	Cell Signaling	R, H	46/54	1:1000
JNK	Cell Signaling	R, H	46/54	1:1000
pp38	Cell Signaling	R	38	1:1000
p38	Cell Signaling	R	38	1:1000
PEPCK	Santa Cruz	H	62	1:1000
PGC-1 α	Santa Cruz	R, H	90	1:1000
PGC-1 β	Abcam	R, H	113	1:1000
PRXIII	Santa Cruz	R	26	1:500
MnSOD	Santa Cruz	H	25	1:500
TFAM	Cell Signaling	H	24	1:1000
TFAM	Donació del Dr. H. Inagaki	R	24	1:1000
UCP2	Santa Cruz	R	35	1:1000

H, humà; R, rata.

3.3.3. Quantificació dels grup carbonils a proteïnes

Tant les ROS, de manera directa, com els productes derivats de l'estrès oxidatiu, poden modificar de forma covalent les proteïnes, donant lloc a oxidació proteica. Un dels productes més comuns de l'oxidació de les proteïnes és la formació de grups carbonils, degut a la interacció del radical hidroxil amb la cadena lateral d'aminoàcids de Pro, Arg, Lys i Thr. Aquests derivats són químicament estables i s'utilitzen per quantificar el dany oxidatiu a proteïnes (Irazusta *et al.* 2010).

Els grups carbonils es van detectar mitjançant un sistema slot-blot emprant un kit comercial (Oxiselect Protein Carbonyl Immunoblot Kit, Cell Biolabs Inc., San Diego, California, Estats Units). Després de realitzar una electroforesis i una transferència tradicionals, la membrana de nitrocel·lulosa es va derivatitzar amb 2,4-dinitrofenilhidrazona. Aquest compost reacciona amb els grups carbonils per formar 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNP), que pot ser detectat per un anticòs específic seguint el protocol normal del Western blot (veure apartat 3.3.2. i taula 3).

3.3.4. Determinació de la peroxidació lipídica

Durant el procés de peroxidació lipídica, els radicals lliures ataquen els àcids grassos i generen aldehyds reactius, com el 4-hidroxinonenal (HNE) (Esterbauer *et al.* 1991). Aquests grups poden reaccionar amb els residus d'His i Lys de les proteïnes, formant uns adductes estables que són capaços de ser detectats mitjançant l'anticòs adequat.

Per a la mesura de la peroxidació lipídica es va realitzar un Western blot de manera tradicional, utilitzant l'anticòs específic capaç de reconèixer els adductes del HNE amb les proteïnes (taula 3). Com a resultat del revelat, es va obtenir un codi de bandes al llarg del carril que es corresponia a les diferents proteïnes complexades amb el HNE (fig. 16), constituint una mesura directa de la peroxidació lipídica.

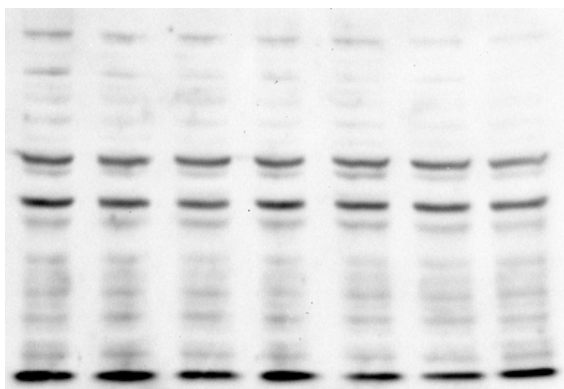


Figura 16. Exemple del revelat obtingut en la determinació de la peroxidació lipídica.

3.3.5. Obtenció del DNA

El DNA de les mostres provinents de l'experiment amb rates OVX es va extreure per digestió amb proteïnasa K (100 µg/µl) en tampó 50 mM KCl, 10 mM Tris, 2,5 mM MgCl₂ i 0,5% Tween 20 (Justo *et al.* 2005b). Les mostres s'incubaren tota la nit a 37°C i llavors es bulliren durant 5 min per inactivar l'enzim. El DNA es va linealitzar per digestió amb l'enzim de restricció Bcl I durant 3h a 50°C, i seguidament es van bullir les mostres 5 min. Després d'una centrifugació a 7000g durant 5 min, es va recuperar el sobrenedant.

Per a les mostres provinents de l'experiment amb rates alimentades amb HFD, l'extracció del DNA es va realitzar amb un kit d'extracció comercial (Roche Diagnostics). Uns 17 mg de teixit es van lissar mitjançant una incubació amb proteïnasa K en presència de l'agent caotròpic hidrocloreur de guanidina per tal d'inactivar les nucleases de manera immediata. Seguidament s'utilitzà un sistema de columnes amb filtres que uneixen selectivament els àcids nucleics i descarten els altres components cel·lulars.

En el cas de les cèl·lules HepG2, l'extracció del DNA és va dur a terme mitjançant el TriPure Isolation Reagent®. Un cop precipitat el DNA (veure apartat 3.2.5.1.), es van eliminar les restes de fenol a través de 3 rentats amb citrat sòdic 0,1 M en etanol 10% i un amb etanol 75%. Finalment, els precipitats de DNA es van dissoldre en NaOH 8 mM i EDTA 1 mM.

La concentració de DNA es va determinar amb un espectrofotòmetre (Nanodrop, Bio-Tek) mesurant l'absorbància a 260 nm, longitud d'ona a la qual absorbeixen les bases nitrogenades. La puresa del DNA es va avaluar mitjançant el rati A260/A280, que per mostres pures de DNA se situa al voltant de 1,8. Contaminacions amb proteïnes, fenols o altres causen modificacions notables en aquest rati. Per acabar, el DNA es va emmagatzemar a -80°C fins al seu ús.

3.3.6. Obtenció del RNA

El RNA total es va obtenir de les diferents mostres de fetge o de les cèl·lules HepG2 a partir de l'ús del TriPure Isolation Reagent®. Al cas del fetge, es van homogeneïtzar uns 100 mg de teixit immersos en 1 ml del reactiu. Un cop separades les fases (veure apartat 3.2.5.1.), es va recuperar la fase superior aquosa, que contenia el RNA, a un nou tub. El RNA es va fer precipitar afegint isopropanol i centrifugant a 12000g durant 10 min. Després de descartar el sobrenedant, es va precipitar novament el RNA afegint etanol 75% i centrifugant a 7500g durant 5 min. Després de deixar assecar l'etanol, els pellets de RNA es van resuspendre en aigua lliure de RNAses, en un procés afavorit per la incubació de les solucions a 60°C durant 15 min.

Seguidament es va quantificar la concentració de RNA mesurant l'absorbància a 260 nm mitjançant l'espectrofotòmetre Nanodrop (Bio-Tek). En aquest cas, mostres pures de RNA tenen un rati A260/A280 al voltant de 2. El rati és una mica més elevat que pel DNA, ja que l'uracil, en comparació a la timina, té major absorbància. Finalment, el RNA es va emmagatzemar a -80°C fins al seu ús.

3.3.7. Determinació de l'expressió gènica

3.3.7.1. Retrotranscripció

La retrotranscripció és el procés a través del qual a partir d'una molècula de RNA s'obté la molècula complementària de DNA (cDNA) a través de l'acció d'una transcriptasa inversa. El cDNA és biològicament més estable que el RNA, motiu pel qual és extensament utilitzat per a la determinació de l'expressió gènica mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa (PCR). A més, la PCR funciona de manera eficient amb cDNA i no amb RNA.

El RNA obtingut de les diferents mostres (veure apartat 3.3.6.) es va retrotranscriure a cDNA. Per a tal fi, es va dissoldre 1 µg de RNA en 5 µl

totals d'aigua lliure de RNAses i es va desnaturalitzar a 90°C durant 1 min. Seguidament es van afegir 5 µl de mix de retrotranscripció, amb les concentracions finals dels següents components: Tris 10 mM pH 9, KCl 50 mM, Tritó X-100 0,1%, MgCl₂ 2,5 mM, hexàmers aleatoris 2,5 µM, 500 µM de cada dNTP, inhibidor de RNAses 1 U/µl, transcriptasa inversa MuLV 1,5 U/µl. El RNA va ser retrotranscrit durant 1h a 42°C, temperatura òptima de la transcriptasa inversa. Llavors es va realitzar una incubació a 95°C durant 5 min per desnaturalitzar els àcids nucleics i es va baixar la temperatura a 4°C. El cDNA obtingut es va diluir 1/10 amb aigua lliure de RNAses i es va emmagatzemar a -20°C fins al seu ús.

3.3.7.2. PCR quantitativa

La PCR quantitativa (qPCR) és una variant de la PCR tradicional, que es caracteritza per amplificar el DNA i quantificar-ne el producte resultant de forma simultània (fig. 17).

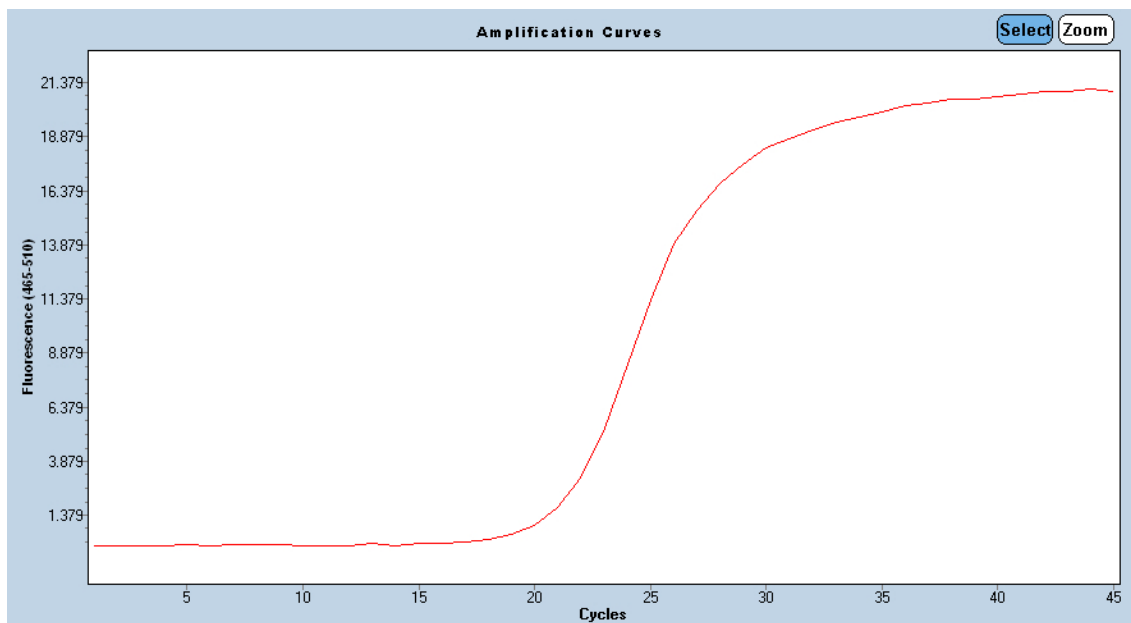


Figura 17. Exemple de corba d'amplificació obtinguda en la qPCR. Es representa la fluorescència emesa a cada cicle. La corba pertany a l'amplificació del gen FABP1 d'una mostra de cDNA provinent de les cèl·lules HepG2, amb un Cp de 20,91. Cp, cicle llindar d'expressió.

La qPCR es realitza afegint una substància marcada amb un fluoròfor que emet fluorescència quan és excitat a la longitud d'ona apropiada. La mesura de la fluorescència es realitza després de cada cicle d'amplificació, de manera que s'obté una corba on es pot analitzar la progressió del procés d'amplificació. Així, i durant els primers cicles, la fluorescència emesa és basal, però a partir d'un determinat cicle, la corba de fluorescència creix de forma exponencial. S'anomena cicle llindar d'expressió (Cp, de l'anglès *crossing point*) al cicle en el qual la fluorescència emesa excedeix aquesta línia de fluorescència de fons i forma la corba exponencial. El Cp depèn dels nivells d'expressió del gen diana, de manera que pot ser utilitzat per determinar l'expressió relativa d'aquest gen.

Aquesta tècnica es va utilitzar per quantificar l'expressió gènica a partir de mostres de cDNA (veure apartat 3.3.7.1.) o de DNA (veure apartat 3.3.5.).

La qPCR es va dur a terme en un termociclador LightCycler® 480 System II (Roche Diagnostics). Pel cDNA, i en un volum total de 10 µl, es van carregar 2,5 µl de mostra a dilució 1/10, 5 µl de SYBR Green Master (Roche Diagnostics), i els corresponents encebadors a una concentració de 0,374 µM cada un. El SYBR Green Master, a més dels components convencionals de la PCR (tampó, dNTPs, MgCl₂ i DNA polimerasa) inclou el SYBR Green I, un agent intercalant que quan s'introdueix a la doble hèlix de DNA incrementa la seva emissió fluorescent. El programa d'amplificació es basa en una desnaturalització inicial del DNA (95°C, 5 segons), seguit per uns 40–45 cicles consistents en una desnaturalització (95°C, 10 segons), alineament (temperatura depenent dels encebadors, 10 segons) i extensió (72°C, 12 segons). Finalment, es realitza un programa de pujada de la temperatura a 97°C per tal d'identificar el producte de la PCR.

Per determinar els nivells de mtDNA, es van amplificar 5 ng de DNA mitjançant l'ús d'un parell d'encebadors específics per al gen

mitocondrial de la subunitat 4 de la NADH deshidrogenasa. El procés d'amplificació fou el mateix que el seguit pel cDNA.

En tots els casos, l'expressió dels gens diana analitzats va ser corregida per la del gen de referència GAPDH.

La informació referent als encebadors utilitzats apareix a la taula 4. La temperatura d'alineament ha estat de 60°C en tots els casos, llevat de la de rNRF1 i rAdiponectina (55°C).

Taula 4. Informació sobre els encebador utilitzats en la qPCR.

Encebadors per gens de rata			
Gen	Encebador directe (5' → 3') Encebador revers (3' → 5')	Nombre d'accés	Longitud amplificat (pb)
Adiponectina	GAAGGGAGAGAAGGGAGACG CGCTGAATGCTGAGTGATAACA	NM_144744	158
CD36	CTCACACAACTCAGATACTGCTG TCCAAACACAGCCAGGACAG	NM_031561	200
CPT1A	CGCACATTAGACCGTGAGGA CCTTGAAGTACCGCCCTCTG	NM_031559	184
mtDNA	TACACGATGAGGCAACCAAA GGTAGGGGGTGTGTTGTGAG	NC_001665	162
FABP1	TGCGAACTGGAGACCATGAC TGTAGACGATGTCACCCAGTG	NM_012556	157
GAPDH	ACTTTGGCATCGTGGAAGGG CCGTTCACTCTGGGATGAC	NM_017008	178
MCAD	AACAGAGCAGGAAGGCATCA TCCTCTCTGGCAAACCTCCG	NM_016986	195
MTP	ACCTGAGAACCTGTCCAACG CCAGGATGGCTTCCAGTGAG	NM_001107727	182
NRF1	TTACTCTGCTGTGGCTGATGG CCTCTGATGCTTGGCTCGTCT	NM_001100708	88
PEPCK	GGGGGTGTTTACTGGGAAGG GCGGGTCAATAATGGGACA	NM_198780	161
Perilipina V	CACTGTGCTGAGGCGCT ACGCACAAAGTAGCCCTGTT	NM_001134637	181
PGC-1 α	ATCTACTGCCTGGGGACCTT ATGTGTCGCCCTTCTTGCTCT	NM_031347	180
PGC-1 β	ACTATGATCCCACGTCTGAAGAGTC CCTTGTCTGAGGTATTGAGGTATTC	NM_176075	152
PON1	TGGGCCTGTCATGGTCCAATGTTG TTATCCACAAGGGTGTCAAAGCTGAG	NM_032077	217
PPAR α	TGCCTTCCCTGTGAACTGAC GCTTCAAGTGGGGAGAGAGG	NM_013196	151
PPAR γ	TCAGAGGGACAAGGATTCATGA CACCAAAGGGCTTCCGCAGGCT	NM_013124	61
SREBP-1c	CGCTACCGTTCCTCTATCAATGAC AGTTTCTGGTTGCTGTGCTGTAAG	NM_001276707	140
TFAM	GCTAAACACCCAGATGCAAAA CGAGGTCTTTTTGGTTTTCC	NM_031326	269

Encebadors per gens d'humans			
Gen	Encebador directe (5' → 3') Encebador revers (3' → 5')	Nombre d'accés	Longitud amplificat (pb)
ACOX	TTACCGTTGGTGACATCGGC CCCACAAGGAAGGACCTGAC	NM_004035	199
CD36	TGTGCCTATTCTTTGGCTTAATGAG ATAAAAGCAACAAACATCACCACAC	NM_001001548	150
COX I	TACGTTGTAGCCCACTTCCACT GGATAGGCCGAGAAAGTGTGT	NG_046415	189
CPT1A	TGGCCTTTCAGTTCACGGTC ACGATAAGCCAACCTGGAGGG	NM_001876	172
mtDNA	CCTGACTCCTACCCCTCACA ATCGGGTGATGATAGCCAAG	KY573997	198
FABP1	CGGAAATCGTGAGAATGGG TTGTCACCTTCCAACCTGAACCA	NM_001443	151
FAS	ACCTCCGTGCAGTTCTTGAG GTTCAGGATGGTGGCGTACA	NM_004104	159
FATP2	ATCGGTGAACCTGCTTCGGTAT ATTGCCTTCAGTGGCAGCAT	NM_003645	171
GAPDH	CTGGTGGTCCAGGGGTCTTA CCTCCTCCACCTTTGACG	NM_002046	156
MCAD	GGCCAGCGATGTTCAGATACT CCTTTCAGGGCATACTTGGT	NM_000016	198
MTP	AAAGTACACGGCCATTCCCA TTCTTCGCAGTCTGAGGTG	NM_000253	177
NRF1	GTAGCCACATTGGCTGATGC CTCTGATGCTTGCGTCTCT	NM_005011	150
PEPCK	AGCTCAGAGGATGAACC CCACAAAGACTCCATGTTGCC	NM_002591	196
PGC-1α	CACTCCTCCTCATAAAGCCAAC GGACTTGCTGAGTTGTGCATA	NM_001330751	190
PGC-1β	GCTGACAAGAAATAGGAGAGGC TGAATTGGAATCGTAGTCAGTG	NM_133263	184
PPARα	CGGTGACTTATCCTGTGGTCC CGGTCCGACTTGTGCATACAC	NM_001001928	184
SREBP-1c	TAAGTCTGCGCACTGCTGTC TGAAAGGTGAGCCAGCATC	NM_001005291	157
TFAM	GTGGTTTTTCATCTGTCTTGGC ACTCCGCCCTATAAGCATCTTG	NM_003201	200
UCP2	ACAAGACCATTGCCCCGAGAG GGCAAGGGAGGTCATCTGTC	NM_003355	162

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

L'eficiència del procés de la PCR és la fracció de molècules diana de DNA que són amplificades. De manera ideal, el nombre de còpies de DNA diana s'hauria d'amplificar el doble a cada cicle (eficiència de 2). No obstant, aquesta eficiència depèn de varis factors, com del disseny dels encebadors.

Per calcular l'eficiència d'amplificació, es van recollir els amplificats de la PCR i, després de realitzar un banc de dilucions seriat de 10^{-3} a 10^{-9} , es va tornar a realitzar una nova PCR amb totes aquestes concentracions. Representant el logaritme de la concentració relativa front el C_p s'obté una recta, el pendent de la qual es correspon amb l'eficiència.

El càlcul de l'expressió gènica es va realitzar amb el programa Genex Standard Software (MultiD Analyses AB, Suècia), tenint el compte els C_p tant del gen diana com del gen de referència, i els valors d'eficiència de cada gen.

3.3.7.4. Anàlisi de l'especificitat de l'amplificació

L'especificitat de l'amplificació es va avaluar mitjançant l'anàlisi del pic de la temperatura de fusió (T_m , de l'anglès *melting temperature*) (fig. 18). La T_m es calcula després de l'amplificació del gen diana, mitjançant una pujada progressiva de la temperatura fins a 97°C . D'aquesta manera la fluorescència cau i s'obté el valor de T_m , que es defineix com aquella temperatura a la qual la meitat de les molècules de DNA estan desnaturalitzades. La T_m és característica de cada amplificat i depèn de factors com la seva llargària o el contingut de G+C. Si l'amplificació és específica s'obté un sol pic de T_m ; no obstant, si es formen altres productes es generen varis pics.

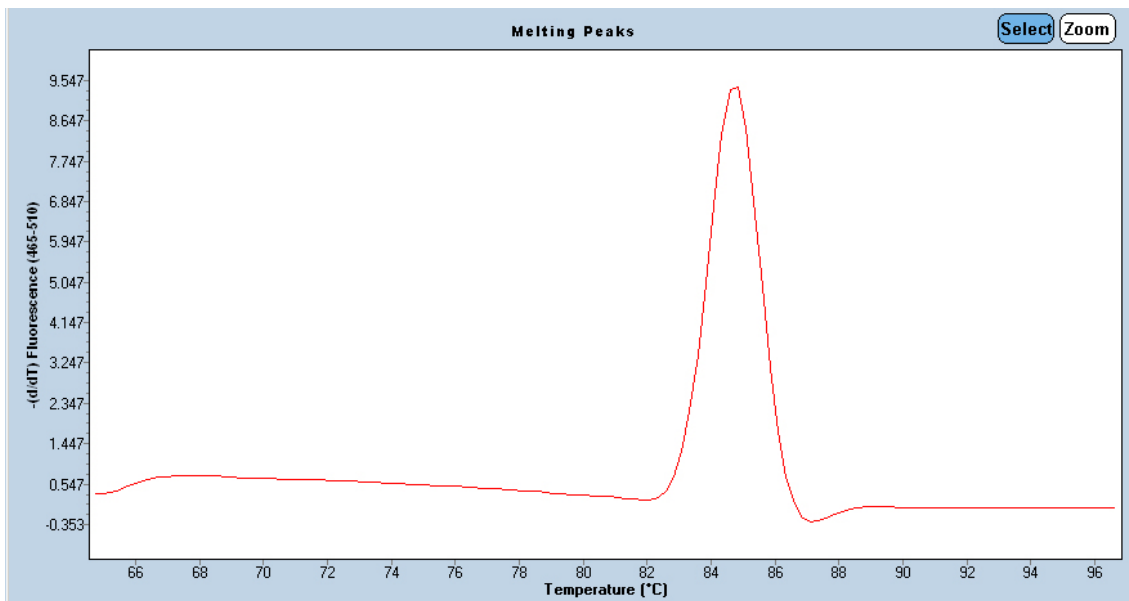


Figura 18. Exemple del pic de la T_m obtingut en la qPCR. La T_m s'identifica com el punt més alt de la derivada negativa de la corba de desnaturalització. L'existència d'un sol pic, a 84,73°C, indica que s'ha amplificat de manera específica el gen diana, en concret FABP1 d'una mostra provinent de cDNA de cèl·lules HepG2. T_m , temperatura de fusió.

A més a més, l'especificat de l'amplificat també era rutinàriament comprovat mitjançant una electroforesi en gel d'agarosa. Es van carregar 2,5 μ l d'una mescla d'amplificats d'un mateix gen en un gel d'agarosa al 1,5% (agarosa en tampó Tris–borat–EDTA) amb bromur d'etidi 1%. Seguidament es va realitzar una electroforesi a 80 V durant 45 min. El bromur d'etidi és un agent intercalant capaç d'insertar-se al DNA, de manera que permet comprovar la presència d'una sola banda (en el cas que l'amplificació hagi estat específica) mitjançant l'exposició a llum ultraviolada amb el captador Chemidoc XRS (Bio–Rad).

3.4. Anàlisi estadístic

Els anàlisis estadístics es van dur a terme utilitzant el software IBM SPSS 20.0 per a Mac OSX.

3.4.1. Anàlisi estadístic dels resultats de l'experiment amb rates OVX

Les dades estan expressades com a mitjana \pm error estàndard de la mitjana de 6 animals per grup i les diferències es van considerar significatives quan el valor de p era inferior a 0,05. Els efectes de l'ovariectomia i de la suplementació amb E2 (efecte hormona) van ser analitzats mitjançant un anàlisi de variància (ANOVA). El test de la mínima diferència significativa (LSD, de l'anglès *Least significant difference*) es va aplicar com a post-hoc per determinar entre quins grups existien diferències.

3.4.2. Anàlisi estadístic dels resultats de l'experiment amb rates alimentades amb dieta hiperlipídica i sotmeses a tractament farmacològic

Les dades estan expressades com a mitjana \pm error estàndard de la mitjana de 7 animals per grup i les diferències es van considerar significatives quan el valor de p era inferior a 0,05. Per analitzar les diferències entre sexes en l'efecte de la HFD, es va aplicar un test ANOVA de dos factors (sexe i HFD). Les diferències entre sexes en la resposta a la Rsg també es van avaluar mitjançant un ANOVA de dos factors (sexe i Rsg). En ambdós casos es va aplicar el test t de Student com a post-hoc.

3.4.3. Anàlisi estadístic dels resultats dels experiments amb cèl·lules HepG2

Les dades estan expressades com a mitjana \pm error estàndard de la mitjana de 6 mostres per tractament obtingudes a partir d'experiments

realitzats de manera independent per triplicat. Les diferències es van considerar significatives quan el valor de p era inferior a 0,05. Per a l'experiment dels efectes de l'E2 sobre la funció i la biogènesi mitocondrials (apartat 4.1.) es va aplicar el test t de Student. A l'experiment de lipotoxicitat i disfunció mitocondrial (apartat 4.2.), els efectes del PA i l'E2 es van analitzar mitjançant un ANOVA de dos factors (E2 i PA) i el test t de Student com a post-hoc. Els efectes del compost C en comparació a la situació basal es van determinar amb el test t de Student.

4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

4.1. Efectes dels estrògens sobre la funció i la biogènesi mitocondrials del fetge. Implicació dels PGCs

L'objectiu d'aquest estudi es va centrar en aclarir la implicació de l'E2 en les diferències en la funció i la biogènesi mitocondrials que prèviament havíem observat al fetge de rates mascle i femella (Justo *et al.* 2005a; Valle *et al.* 2007; Nadal-Casellas *et al.* 2010). A més, es va estudiar la contribució de PGC-1 α i PGC-1 β com a possibles mediadors d'aquests efectes.

Els resultats presentats en aquest estudi es van obtenir a partir d'experiments realitzats amb rates ovariectomitzades (OVX) i amb cèl·lules HepG2, ambdós models tractats amb E2. A més, l'expressió gènica de PGC-1 α i PGC-1 β es va silenciar als hepatòcits HepG2.

4.1.1. Resultats

Pesos corporal i hepàtic, índex d'adipositat, nivells de TG hepàtics i nivells circulants d'E2 i d'insulina

El pes corporal i l'adipositat augmentaren en resposta a l'ovariectomia, i van disminuir amb l'administració d'E2, encara que el pes corporal va ser més alt que el del grup control (taula 5). El pes del fetge i el contingut de TG també es van incrementar a les rates OVX, mentre que l'administració d'E2 va resultar en una recuperació d'aquests paràmetres. En canvi, el pes relatiu d'aquest òrgan va ser menor als animals OVX i augmentà amb el tractament hormonal. L'ovariectomia va disminuir els nivells sèrics d'E2, però sense assolir una diferència significativa, mentre que el tractament amb E2 els augmentà. Els nivells sèrics d'insulina es van incrementar al grup OVX+E2, mentre que es van restablir amb l'administració d'E2.

Taula 5. Efecte de l'ovariectomia i l'administració d'E2 sobre els pesos corporal i hepàtic, l'índex d'adipositat, els nivells de TG hepàtics i els nivells circulants d'E2 i d'insulina.

	Control	OVX	OVX+E2	ANOVA
Pes corporal (g)	218 ± 5	298 ± 6 ^a	242 ± 5 ^{ab}	H
Índex d'adipositat (%)	4,80 ± 0,68	7,27 ± 0,44 ^a	5,30 ± 0,28 ^b	H
Pes fetge				
(g)	5,84 ± 0,11	6,64 ± 0,17 ^a	6,08 ± 0,16 ^b	H
(g/100 g PC)	2,67 ± 0,06	2,19 ± 0,04 ^a	2,63 ± 0,04 ^b	H
TG (mg/g txt)	20,9 ± 0,5	24,2 ± 0,6 ^a	19,6 ± 0,6 ^b	H
E2 (%)	100 ± 24	61,3 ± 9,7	240 ± 103 ^{ab}	H
Insulina (ng/ml)	0,40 ± 0,01	0,51 ± 0,04 ^a	0,40 ± 0,02 ^b	H

L'índex d'adipositat és la suma dels pesos dels dipòsits adiposos blancs gonadal, retroperitoneal i mesentèric relativa a 100 g de pes corporal. OVX, rates ovariectomitzades; OVX + E2, rates OVX tractades amb 17β-estradiol; PC, pes corporal; TG, triglicèrids; E2, 17β-estradiol. Els valors s'expressen com a mitjana ± error estàndard de 6 animals per grup. ANOVA (p<0,05): H, efecte hormona. Post-hoc (LSD, p<0,05): a, diferència respecte al grup control; b, diferència respecte al grup OVX.

Evolució del pes corporal i de la ingesta

Fins a les 10 setmanes d'edat, el pes corporal (fig. 19A) i la ingesta diària (fig. 19B) de les rates control va ser menor que a les rates OVX. L'administració d'E2 va provocar una reducció d'ambdós paràmetres. Pel que fa a la ingesta diària, la de les rates OVX+E2 va caure per sota dels nivells control, tot i que al final de l'experiment les ingestes dels tres grups experimentals s'igualaren. El perfil de la ingesta referida al pes corporal (fig. 19C), ens indica que els tres grups experimentals partiren de nivells molt semblants, encara que a partir de la setmana 10 d'edat els animals control mantingueren una major ingesta. Amb l'administració d'E2, la ingesta referida al pes corporal va disminuir i es va igualar amb la del grup de rates OVX al final del període estudiat.

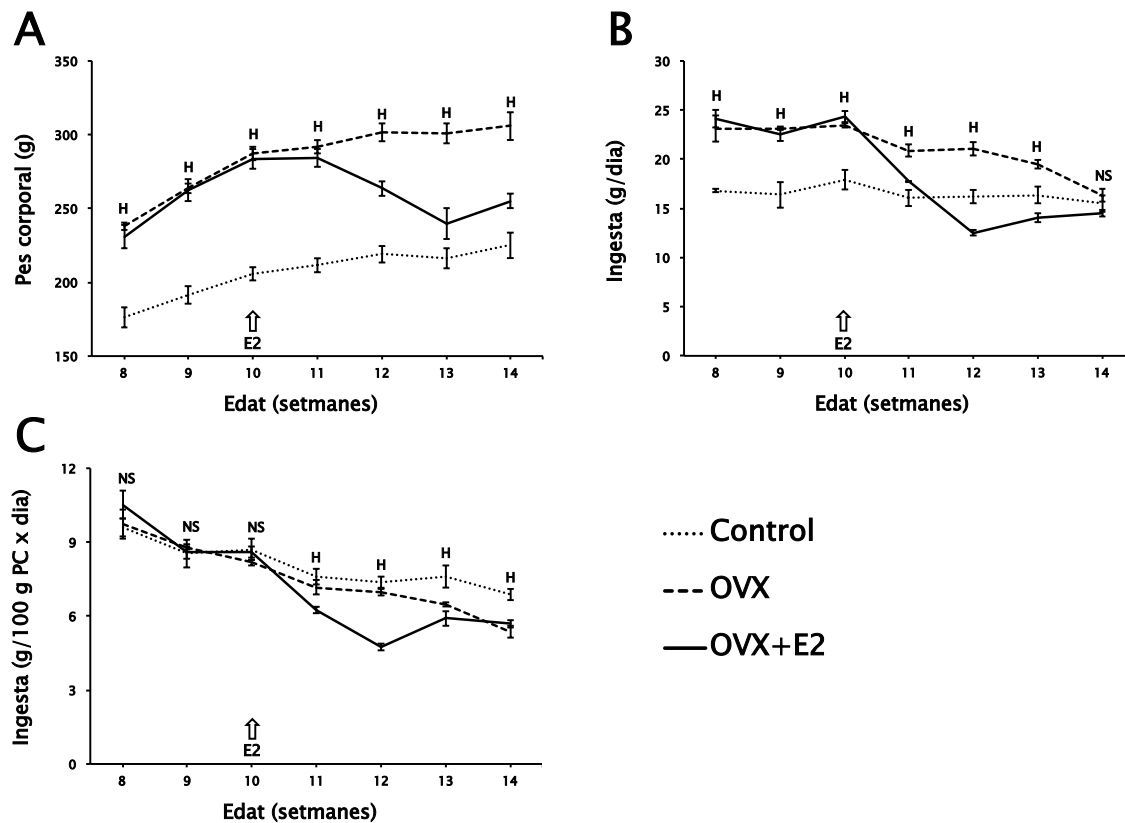


Figura 19. Evolució del pes corporal (A) i la ingesta (B i C) en resposta a l'ovariectomia i l'administració d'E2. La fletxa marca l'inici del tractament amb E2. E2, 17β -estradiol; OVX, rates ovariectomitzades; OVX + E2, rates OVX tractades amb 17β -estradiol; PC, pes corporal. Els valors s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de 6 animals per grup. ANOVA ($p < 0,05$): H, efecte hormona; NS, cap efecte significatiu.

Marcadors de biogènesi i funció mitocondrials a fetge de rata i a cèl·lules HepG2

L'ovariectomia va alterar la funció i la biogènesi mitocondrials, tal i com indicaren els menors nivells de mRNA i/o de proteïna dels marcadors PGC- 1β , TFAM i ATPasa (figs. 20A, 20C i 20D). Per la seva banda, el grup OVX+E2 va incrementar els nivells de mRNA i/o de proteïna de PGC- 1β , NRF1, COX I i ATPasa. No hi va haver diferències en els nivells proteics de PGC- 1α entre els grups experimentals, tot i que els nivells de mRNA augmentaren amb l'administració de l'hormona. Les rates OVX+E2 també augmentaren els nivells de mtDNA en comparació als grups control i OVX, encara que la disminució que es produí amb l'ovariectomia no fou estadísticament significativa ($p=0,077$) (fig. 20A).

L'activitat COX no es va alterar amb l'ovariectomia (fig. 20B), mentre que l'administració d'E2 l'augmentà per sobre els valors controls. Per altra banda, l'activitat CS va disminuir al grup OVX, però no es va restaurar amb el tractament amb E2.

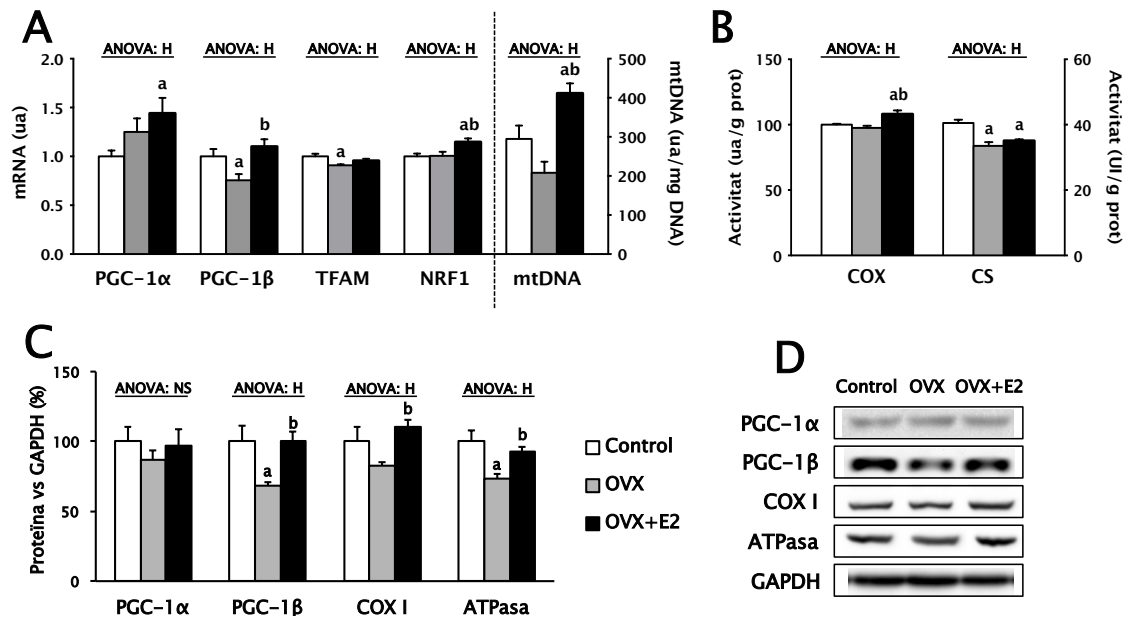


Figura 20. Efecte de l'ovariectomia i l'administració d'E2 sobre marcadors de biogènesi i funció mitocondrials al fetge. Nivells de mRNA i mtDNA (A), nivells proteics (B), activitats COX i CS (C), i immunoblots representatius (D). Els nivells de mRNA s'expressen en unitats arbitràries (ua); els nivells proteics s'han normalitzat per la intensitat de GAPDH. L'activitat CS està expressada en unitats internacionals (UI, $\mu\text{mol}/\text{min}$). OVX, rates ovariectomitzades; OVX + E2, rates OVX tractades amb 17β -estradiol; E2, 17β -estradiol; PGC-1 α , coactivador 1 α del receptor activat per proliferadors peroxisomals γ ; PGC-1 β , coactivador 1 β del receptor activat per proliferadors peroxisomals γ ; TFAM, factor de transcripció mitocondrial A; NRF1, factor nuclear de respiració 1; mtDNA, DNA mitocondrial; COX I, subunitat I de la citocrom c oxidasa; COX, citocrom c oxidasa; CS, citrat sintasa; ua, unitats arbitràries. Els valors s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de 6 animals per grup. ANOVA ($p < 0,05$): H, efecte hormona; NS, cap efecte significatiu. Post-hoc (LSD, $p < 0,05$): a, diferència respecte al grup control; b, diferència respecte al grup OVX.

A les cèl·lules HepG2, els nivells de mRNA i de proteïna de PGC-1 β es van incrementar en resposta a la suplementació amb E2, mentre que els de PGC-1 α no van experimentar cap modificació (fig. 21A, 21B i 21C). Els nivells de TFAM, NRF1, COX I, COX IV i ATPase també augmentaren amb el tractament hormonal.

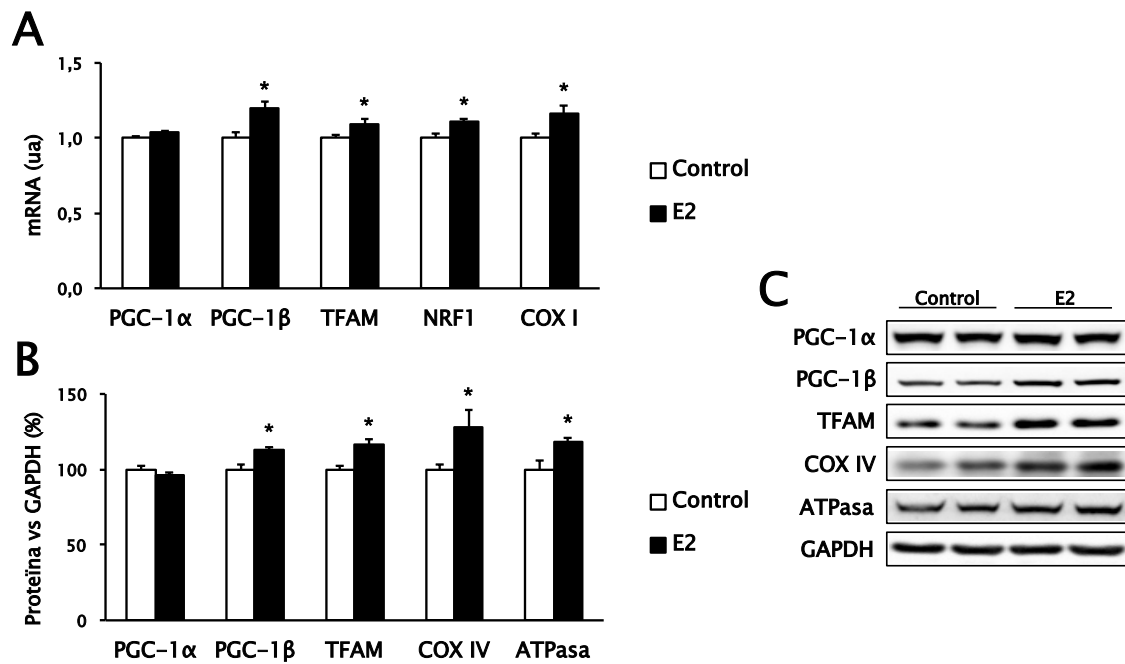


Figura 21. Efecte de l'administració d'E2 sobre marcadors de biogènesi i funció mitocondrials a cèl·lules HepG2. Nivells de mRNA (A) i proteïcs (B), i immunoblots representatius (C). Les cèl·lules van ser tractades amb E2 (10 nM) durant 40h o amb el volum equivalent del vehicle (etanol). Els nivells de mRNA s'expressen en unitats arbitràries (ua); els nivells proteïcs s'han normalitzat per la intensitat de GAPDH. E2, 17β-estradiol; PGC-1α, coactivador 1α del receptor activat per proliferadors peroxisomals γ; PGC-1β, coactivador 1β del receptor activat per proliferadors peroxisomals γ; TFAM, factor de transcripció mitocondrial A; NRF1, factor nuclear de respiració 1; COX I, subunitat I de la citocrom c oxidasa; COX IV, subunitat IV de la citocrom c oxidasa. Els valors s'expressen com a mitjana ± error estàndard de tres experiments duts a terme per duplicat (n=6). Test t de Student ($p < 0.05$): *, diferència respecte al grup control.

A més, les cèl·lules tractades amb E2 van mostrar un augment de la massa mitocondrial i del potencial de membrana mitocondrial (MMP), així com també un major contingut d'ATP (fig. 22).

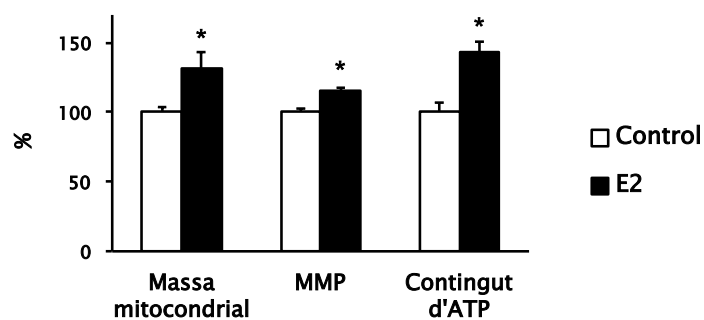


Figura 22. Efecte de l'administració d'E2 sobre la massa mitocondrial, el potencial de membrana mitocondrial i el contingut d'ATP a cèl·lules HepG2. Les cèl·lules van ser tractades amb E2 (10 nM) durant 40h o amb volum

equivalent del vehicle (etanol). E2, 17 β -estradiol; MMP, potencial de membrana mitocondrial. Els valors s'expressen com a mitjana \pm error estàndard (n=8). Test t de Student (p<0.05): *, diferència respecte al grup control.

Marcadors d'estrès oxidatiu i d'inflamació a fetge de rata

L'ovariectomia es va associar amb una disminució de l'activitat SOD, la qual s'incrementà en resposta al tractament amb E2, inclús per sobre dels valors control (taula 6). La peroxidació lipídica (HNE) va augmentar amb l'ovariectomia, però l'administració d'E2 no va revertir completament aquesta situació (taula 6 i fig. 23). Els nivells dels grups carbonils, indicadors del dany oxidatiu proteic, no es van incrementar amb l'ovariectomia, però l'administració d'E2 en va provocar una reducció significativa en comparació amb el grup OVX. Els nivells de mRNA de la perilipina V disminuïren a les rates OVX i es recuperaren amb el tractament amb E2. Per la seva banda, l'ovariectomia va augmentar la fosforilació dels marcadors d'inflamació JNK i p38, efecte que va ser revertit amb l'administració d'E2.

Taula 6. Efecte de l'ovariectomia i l'administració d'E2 sobre marcadors d'estrès oxidatiu i d'inflamació al fetge.

	Control	OVX	OVX+E2	ANOVA
SOD (UI/g proteïna)	10,0 \pm 0,3	8,25 \pm 0,46 ^a	12,9 \pm 1,2 ^{ab}	H
HNE (%)	100 \pm 5	124 \pm 4 ^a	115 \pm 2 ^a	H
Grups carbonils (%)	100 \pm 6	129 \pm 11	77,3 \pm 18,7 ^b	H
Perilipina V (ua)	1,00 \pm 0,05	0,71 \pm 0,08 ^a	1,01 \pm 0,08 ^b	H
pJNK/JNK (%)	100 \pm 4	127 \pm 10 ^a	102 \pm 7 ^b	H
pp38/p38 (%)	100 \pm 3	129 \pm 3 ^a	111 \pm 7 ^b	H

L'activitat SOD està expressada en unitats internacionals (UI, μ mol/min). Els nivells de mRNA s'expressen en unitats arbitràries (ua); els nivells proteics de HNE, pJNK i pp38 s'han normalitzat per la intensitat de GAPDH, JNK i p38 respectivament. OVX, rates ovariectomitzades; OVX + E2, rates OVX tractades amb 17 β -estradiol; SOD, superòxid dismutasa; HNE, 4-hidroxinonenal; JNK, cinasa de l'extrem N-terminal de c-Jun. Els valors s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de 6 animals per grup. ANOVA (p<0.05): H, efecte hormona. Post-hoc (LSD, p<0.05): a, diferència respecte al grup control; b, diferència respecte al grup OVX.

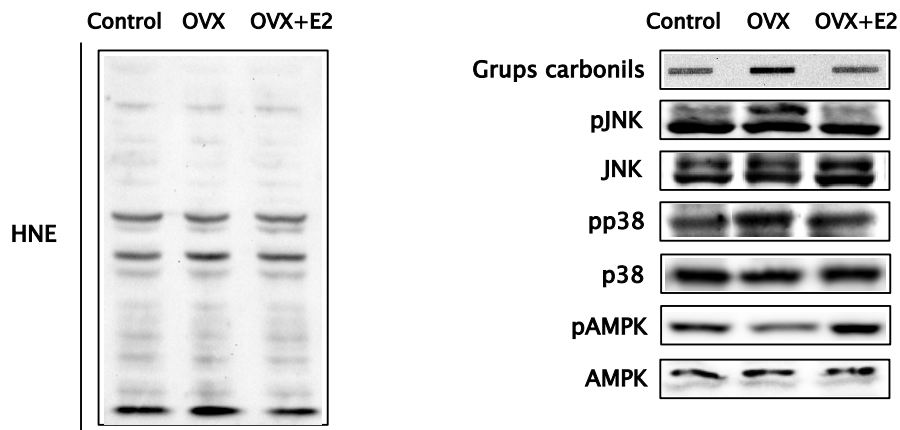


Figura 23. Immunoblots representatius de marcadors d'estrès oxidatiu i d'inflamació, i d'AMPK. OVX, rates ovariectomitzades; OVX + E2, rates OVX tractades amb 17β -estradiol; HNE, 4-hidroxinonenal; JNK, cinasa de l'extrem N-terminal de c-Jun; AMPK, cinasa activada per AMP.

Marcadors del metabolisme glucídic i lipídic a fetge de rata i a cèl·lules HepG2

Els nivells de mRNA de PEPCK, CPT1A, SREBP-1c i PPAR γ augmentaren amb l'ovariectomia (taula 7), mentre que el tractament amb E2 en va restaurar tots els valors llevat dels de CPT1A, que disminuïren respecte al grup OVX però sense arribar als valors control. L'activació d'AMPK va augmentar al grup OVX+E2 en comparació a les rates ovariectomitzades (taula 7 i fig. 23). Per la seva banda, els nivells de mRNA de PPAR α i MCAD no es veren afectats per l'ovariectomia, tot i que van augmentar significativament amb el reemplaçament hormonal. Finalment, l'expressió de CD36 va disminuir a les rates OVX i es va restablir en part amb la suplementació d'E2.

Taula 7. Efecte de l'ovariectomia i l'administració d'E2 sobre marcadors del metabolisme glucídic i lipídic al fetge.

	Control	OVX	OVX+E2	ANOVA
PEPCK (ua)	1,00 ± 0,03	1,58 ± 0,11 ^a	1,14 ± 0,09 ^b	H
pAMPK/AMPK (%)	100 ± 6	79,4 ± 7,5	114 ± 8 ^b	H
PPAR α (ua)	1,00 ± 0,07	0,99 ± 0,10	1,38 ± 0,05 ^{ab}	H
CPT1A (ua)	1,00 ± 0,11	1,75 ± 0,05 ^a	1,59 ± 0,04 ^a	H
MCAD (ua)	1,00 ± 0,05	0,97 ± 0,03	1,10 ± 0,02 ^b	H
CD36 (ua)	1,00 ± 0,08	0,30 ± 0,01 ^a	0,55 ± 0,06 ^{ab}	H
SREBP-1c (ua)	1,00 ± 0,08	1,46 ± 0,08 ^a	0,88 ± 0,15 ^b	H
PPAR γ (ua)	1,00 ± 0,09	1,81 ± 0,27 ^a	0,87 ± 0,11 ^b	H

Els nivells de mRNA s'expressen en unitats arbitràries (ua); els nivells proteics de pAMPK s'han normalitzat per la intensitat d'AMPK. OVX, rates ovariectomitzades; OVX + E2, rates OVX tractades amb 17 β -estradiol; PEPCK, fosfoenolpiruvat carboxicinas; AMPK, cinasa activada per AMP; PPAR α , receptor activat per proliferadors peroxisomals α , CPT1A, transferasa 1A de palmitoïlcarnitina; MCAD, deshidrogenasa d'acils-CoA de cadena mitjana; CD36, translocasa d'àcids grassos; SREBP-1c, proteïna 1c d'unió a elements reguladors d'esterols; PPAR γ , receptor activat per proliferadors peroxisomals γ . Els valors s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de 6 animals per grup. ANOVA ($p < 0.05$): H, efecte hormona. Post-hoc (LSD, $p < 0.05$): a, diferència respecte al grup control; b, diferència respecte al grup OVX.

Al cas de les cèl·lules HepG2, el tractament amb E2 suposà la disminució de l'expressió de PEPCK, mentre que els nivells de mRNA de PPAR α i CPT1A augmentaren (taula 8). Els nivells de SREBP-1c no s'alteraren amb el tractament amb l'hormona.

Taula 8. Efecte de l'administració d'E2 sobre marcadors del metabolisme glucídic i lipídic a cèl·lules HepG2.

	Control	E2
PEPCK (ua)	1,00 ± 0,03	0,87 ± 0,02 ^a
PPAR α (ua)	1,00 ± 0,05	1,13 ± 0,04 ^a
CPT1A (ua)	1,00 ± 0,04	1,13 ± 0,03 ^a
SREBP-1c (ua)	1,00 ± 0,03	0,95 ± 0,03

Les cèl·lules van ser tractades amb E2 (10 nM) durant 40h o amb el volum equivalent del vehicle (etanol). Els nivells de mRNA s'expressen en unitats arbitràries (ua). E2, 17 β -estradiol; PEPCK, fosfoenolpiruvat carboxicinas; PPAR α , receptor activat per proliferadors peroxisomals α , CPT1A, transferasa 1A de palmitoïlcarnitina; SREBP-1c, proteïna 1c d'unió a elements reguladors d'esterols. Els valors s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de tres experiments duts a terme per duplicat (n=6). Test t de Student ($p < 0.05$): a, diferència respecte al grup control.

Marcadors de biogènesi i funció mitocondrials a cèl·lules HepG2 amb PGC-1 α i PGC-1 β silenciats

A les cèl·lules HepG2 transfectades amb el siRNA control i a les cèl·lules amb el PGC-1 α silenciats, la viabilitat cel·lular va disminuir en un 30–40%, en comparació als hepatòcits no transfectats (fig. 24). El silenciament de l'expressió gènica de PGC-1 β va provocar una reducció d'un 65% de la viabilitat cel·lular.

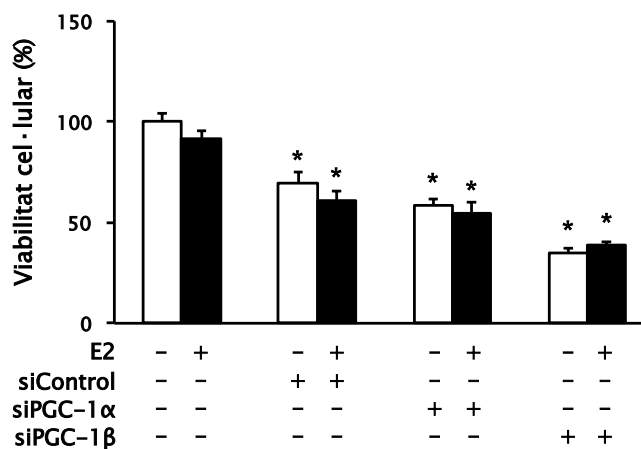


Figura 24. Efecte del silenciament gènica de PGC-1 α i PGC-1 β i del tractament amb E2 sobre la viabilitat cel·lular a cèl·lules HepG2. Les cèl·lules van ser transfectades amb siRNA específics (20 nM) durant 24 h i posteriorment tractades o no amb E2 (10 nM) durant 40h. La viabilitat cel·lular es va avaluar mitjançant la tinció amb cristall violeta. E2, 17 β -estradiol; PGC-1 α , coactivador 1 α del receptor activat per proliferadors peroxisomals γ ; PGC-1 β , coactivador 1 β del receptor activat per proliferadors peroxisomals γ . Els valors s'expressen com a mitjana \pm error estàndard (n=8). Test t de Student ($p < 0.05$): *, diferència respecte al grup control (primera barra).

La inhibició de l'expressió gènica de PGC-1 α i de PGC-1 β es va comprovar mesurant-ne els nivells de mRNA i de proteïna després dels corresponents silenciaments i del tractament amb E2 (taula 9 i fig. 25). Cada siRNA va inhibir l'expressió del seu gen diana en un 34–50%, en comparació als hepatòcits transfectats amb el siRNA control. Tant per a PGC-1 α com per PGC-1 β , l'eficiència del silenciament fou la mateixa.

Taula 9. Efecte del silenciament gènic de PGC-1 α i PGC-1 β , i del tractament amb E2 sobre els seus nivells de proteïna i mRNA a cèl·lules HepG2.

		Control siRNA	PGC-1 α siRNA	PGC-1 β siRNA
PGC-1 α (ua)	- E2	1,00 \pm 0,02	0,66 \pm 0,02 ^b	0,94 \pm 0,02
	+ E2	0,99 \pm 0,07	0,65 \pm 0,03 ^b	0,91 \pm 0,04
PGC-1 α (vs GAPDH)	- E2	100 \pm 1	65,8 \pm 9,3 ^b	93,4 \pm 10,7
	+ E2	96,6 \pm 7,0	57,0 \pm 3,4 ^b	86,0 \pm 14,1
PGC-1 β (ua)	- E2	1,00 \pm 0,03	1,04 \pm 0,01	0,65 \pm 0,05 ^b
	+ E2	1,22 \pm 0,05 ^a	1,16 \pm 0,03 ^a	0,88 \pm 0,02 ^{ab}
PGC-1 β (vs GAPDH)	- E2	100 \pm 2	82,5 \pm 11,7	48,4 \pm 4,4 ^b
	+ E2	119 \pm 7 ^a	117 \pm 4 ^a	71,1 \pm 10,2 ^{ab}

Les cèl·lules van ser transfectades amb siRNA específics (20 nM) durant 24 h i posteriorment tractades o no amb E2 (10 nM) durant 40h. Els nivells de mRNA s'expressen en unitats arbitràries (ua); els nivells proteics s'han normalitzat per la intensitat de GAPDH. E2, 17 β -estradiol; PGC-1 α , coactivador 1 α del receptor activat per proliferadors peroxisomals γ ; PGC-1 β , coactivador 1 β del receptor activat per proliferadors peroxisomals γ . Els valors s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de tres experiments duts a terme per duplicat (n=6). Test t de Student (p<0.05): a, diferència respecte al grup control d'E2; b, diferència respecte al grup control siRNA.

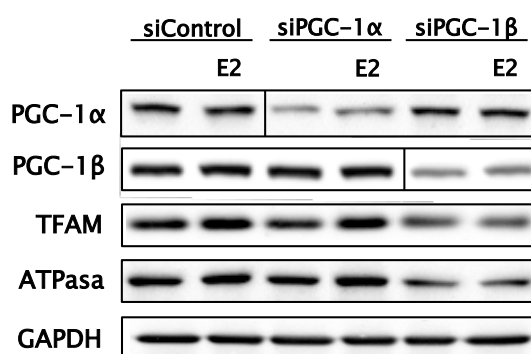


Figura 25. Immunoblots representatius de les determinacions realitzades en els experiments de silenciament. E2, 17 β -estradiol; PGC-1 α , coactivador 1 α del receptor activat per proliferadors peroxisomals γ ; PGC-1 β , coactivador 1 β del receptor activat per proliferadors peroxisomals γ ; TFAM, factor de transcripció mitocondrial A.

El silenciament gènic de PGC-1 β va reduir els nivells proteics de TFAM i d'ATPasa aproximadament un 25% en comparació a la situació basal (figs. 25 i 26). A més, els efectes estimuladors de l'E2 es van perdre. Per contra, el silenciament gènic de PGC-1 α no va alterar els nivells d'aquests marcadors, ni en comparació a les condicions basals ni en resposta al tractament amb E2.

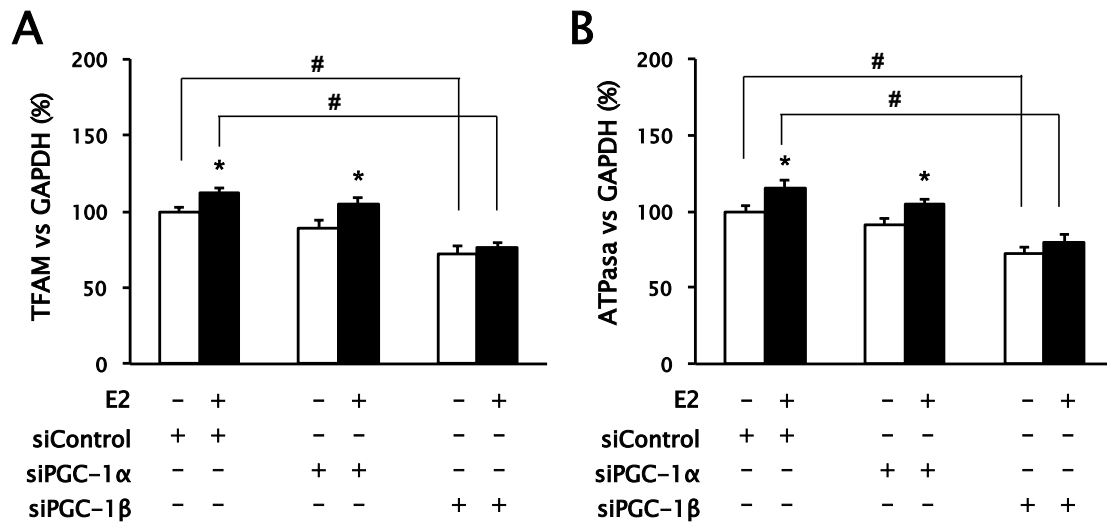


Figura 26. Efecte del silenciament gènic de PGC-1 α i PGC-1 β i del tractament amb E2 sobre els nivells proteics de TFAM (A) i ATPasa (B) a cèl·lules HepG2. Les cèl·lules van ser transfectades amb siRNA específics (20 nM) durant 24h i posteriorment tractats o no amb E2 (10 nM) durant 40h. Els nivells proteics s'han normalitzat per la intensitat de GAPDH. E2, 17 β -estradiol; PGC-1 α , coactivador 1 α del receptor activat per proliferadors peroxisomals γ ; PGC-1 β , coactivador 1 β del receptor activat per proliferadors peroxisomals γ ; TFAM, factor de transcripció mitocondrial A. Els valors s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de tres experiments duts a terme per duplicat (n=6). Test t de Student ($p < 0.05$): a, diferència respecte al grup control d'E2; b, diferència respecte al grup control siRNA.

4.1.2. Discussió

Estudis previs realitzats pel nostre grup de recerca i també per altres investigadors han posat de manifest l'existència d'un dimorfisme sexual en la funció i la biogènesi mitocondrials a varis teixits de rata (Justo *et al.* 2005a; Stirone *et al.* 2005; Gómez-Pérez *et al.* 2008; Guevara *et al.* 2009; Nadal-Casellas *et al.* 2010; Amengual-Cladera *et al.* 2012a; Kemper *et al.* 2014; Gaignard *et al.* 2015), el qual podria estar associat als efectes de les hormones sexuals. En aquest treball, hem demostrat la participació de l'E2 en el manteniment de l'homeòstasi energètica tant al fetge de rates OVX com a cèl·lules HepG2. També hem aportat proves d'un paper actiu del PGC-1 β en la mediació dels efectes de l'E2 sobre la funció dels mitocondris. Aquestes evidències les hem obtingudes en experiments realitzats en cèl·lules HepG2 on s'ha silenciada l'expressió gènica de PGC-1 α o PGC-1 β .

L'ovariectomia va causar un increment del pes corporal i de l'adipositat, atribuïble a la major ingesta que van presentar aquests animals. L'administració d'E2 va provocar una disminució de la ingesta, i com a conseqüència, es van restablir parcialment el pes corporal i l'adipositat, resultats que són coincidents amb estudis similars (Paquette *et al.* 2009; Pantaleão *et al.* 2010; Nigro *et al.* 2014b). Aquests efectes es poden explicar a partir de la regulació hipotalàmica que l'E2 exerceix sobre la ingesta, el pes corporal i l'adipositat (Frank *et al.* 2014).

La disminució dels principals marcadors de diferenciació i proliferació mitocondrial (TFAM i mtDNA) i la reducció de la capacitat oxidativa (activitat CS i nivells d'ATPasa) que va provocar l'ovariectomia són indicatius d'una alteració de la funció i la biogènesi mitocondrials. Aquests resultats suggereixen que la privació de les hormones ovàriques comporta un empitjorament del funcionament mitocondrial, recolzant la implicació dels estrògens en el dimorfisme sexual en la funció i la biogènesi mitocondrials que hem descrit al fetge de rata,

d'acord amb la major capacitat oxidativa i diferenciació mitocondrial al fetge de les femelles en comparació als mascles (Justo *et al.* 2005a; Valle *et al.* 2007; Nadal-Casellas *et al.* 2010).

Es demostra que l'E2 té efectes molt importants sobre la funció mitocondrial. La seva administració a les rates OVX va restablir la funció dels mitocondris mitjançant un augment del contingut mitocondrial i de la capacitat oxidativa. Així mateix, a les cèl·lules HepG2, el tractament amb E2 va incrementar la massa mitocondrial i el potencial de membrana mitocondrial, de manera que augmentà el contingut d'ATP i els nivells de proteïnes essencials involucrades en el metabolisme oxidatiu i la biogènesi mitocondrial.

Les rates OVX també mostraren un grau més elevat d'estrès oxidatiu al fetge, indicat per una reducció de l'activitat SOD i una major peroxidació lipídica, d'acord amb estudis previs (Moreno *et al.* 2015). Per la seva banda, el tractament amb E2 va incrementar la resposta antioxidant, ja que va millorar l'activitat SOD per sobre dels nivells control i va disminuir el dany oxidatiu proteic. A més, els nivells de mRNA de perilipina V van disminuir amb l'ovariectomia i es van restaurar amb el tractament estrogènic. Atès que la perilipina V, situada a les vesícules lipídiques, s'associa a una reducció de la producció de ROS a través del segrest de l'excés d'àcids grassos a teixits com el fetge (Kimmel & Sztalryd 2014), no es pot descartar un paper dels estrògens en la regulació d'aquest gen i, per tant, en la formació de ROS. De manera similar, la inflamació al fetge va augmentar en resposta a l'ovariectomia, tal i com indiquen l'activació de JNK i p38, situació que va ser revertida amb el tractament amb E2. En conjunt, els nostres resultats demostren una implicació activa de l'E2 en la defensa contra l'estrès oxidatiu i en la resposta antiinflamatòria, d'acord amb estudis previs (Borrás *et al.* 2003, 2010; Viña *et al.* 2005; Monteiro *et al.* 2014).

En resposta a l'ovariectomia, tant l'augment de l'expressió de PEPCCK, enzim regulador clau de la gluconeogènesi, com l'acumulació de TG al

fetge, suggereixen defectes notables en els metabolismes glucídic i lipídic com a conseqüència de la privació de les hormones ovàriques. Estudis publicats prèviament han establert connexions entre els estrògens i la sensibilitat a la insulina (Szmuiłowicz *et al.* 2009; Nadal-Casellas *et al.* 2012), la gluconeogènesi hepàtica (Ahmed-Sorour & Bailey 1981; Bryzgalova *et al.* 2006) i el metabolisme lipídic (D'Eon *et al.* 2005; Völzke *et al.* 2007; Paquette *et al.* 2008, 2009; Suzuki & Abdelmalek 2009). Encara que els nivells de PGC-1 α no es van alterar amb l'ovariectomia, els nivells de mRNA de PEPCCK augmentaren, indicant una inducció de la producció de glucosa al fetge. Per tant, l'augment de PEPCCK podria ser atribuït a modificacions post transcripcionals de PGC-1 α que comporten un increment de la seva activitat, com la fosforilació o la desacetilació (Rodgers *et al.* 2005; Jäger *et al.* 2007). La inducció de la lipogènesi en resposta a l'ovariectomia, marcada per l'increment de l'expressió de SREBP-1c i PPAR γ , juntament amb la disminució de la capacitat oxidativa descrita abans, semblen apuntar cap a l'acumulació de TG al fetge. Per la seva banda, el reemplaçament hormonal va restaurar la lipogènesi i va activar l'oxidació d'àcids grassos al fetge, tal com indica l'augment dels nivells de mRNA de PPAR α , CPT1A i MCAD. A més, també es va activar l'AMPK, cinasa que promou l'oxidació d'àcids grassos i que inhibeix tant la síntesi lipídica com la gluconeogènesi (Zhang *et al.* 2009). Aquests fets, juntament amb la millora de la funció mitocondrial, van conduir a una reducció del contingut de TG al fetge. Per tant, l'E2 sembla contribuir al correcte funcionament dels hepatòcits, ja que la privació de les hormones ovàriques produeix una alteració de la funció mitocondrial i del perfil metabòlic, els quals són revertits amb l'administració d'E2.

Tant el PGC-1 α com el PGC-1 β juguen un paper essencial en la regulació de la funció i la biogènesi mitocondrials (Scarpulla 2011). Els nostres resultats suggereixen que el PGC-1 β seria un element clau en els efectes moduladors de l'E2 sobre la funció mitocondrial. Tant als estudis *in vivo* com als *in vitro*, els canvis en la funció dels mitocondris

es van correlacionar positivament amb els canvis proteics de PGC-1 β , mentre que els nivells proteics de PGC-1 α no es van alterar malgrat la manipulació hormonal. Per això, i per aprofundir en la participació de PGC-1 α i PGC-1 β en els efectes mitocondrials de l'E2, es van estudiar les conseqüències del silenciament gènic d'ambdós coactivadors als hepatòcits HepG2 utilitzant siRNA específics. La regulació a la baixa de PGC-1 β va suposar una disminució dels nivells proteics de TFAM i d'ATPasa, tant en situació basal com en resposta al tractament amb E2. No obstant, la regulació a la baixa de PGC-1 α no va alterar aquests marcadors. Així doncs, els nostres resultats proporcionen una forta evidència del paper que juga el PGC-1 β en la modulació de la funció mitocondrial per part de l'E2, atès que ni els nivells de TFAM ni els d'ATPasa s'incrementaren als hepatòcits tractats amb E2 quan l'expressió de PGC-1 β estava inhibida. Contràriament, i quan l'expressió de PGC-1 α estava bloquejada, els nivells proteics de TFAM i d'ATPasa augmentaren en resposta al tractament hormonal. En aquesta línia, els efectes beneficiosos de l'E2 sobre la funció mitocondrial a través de la modulació de PGC-1 β ja s'han suggerit en estudis realitzats a vasos sanguinis cerebrals de rates OVX (Kemper *et al.* 2014). Així mateix, PGC-1 β s'ha considerat un mediador clau de la funció dels mitocondris en el múscul esquelètic de ratolins (Gali Ramamoorthy *et al.* 2015), durant la diferenciació dels preadipòcits de rata (Ji *et al.* 2012), i també a adipòcits de ratolí en resposta al fàrmac rosiglitazona (Pardo *et al.* 2011). Els nostres resultats, per tant, assenyalen el PGC-1 β com un element clau en la modulació de la funció i la biogènesi mitocondrials, encara que la contribució de PGC-1 α no pot ser totalment descartada.

El paper que exerceix PGC-1 β en la protecció del fetge contra l'esteatosi s'ha associat amb la regulació de la funció i la biogènesi mitocondrials, i al balanç equilibrat d'aquests processos amb la síntesi de lípids i la seva secreció (Sonoda *et al.* 2007; Chambers *et al.* 2012; Bellafante *et al.* 2013). Els nostres resultats suggereixen que l'E2 protegeix els hepatòcits contra l'esteatosi a través d'una inducció de la fosforilació

oxidativa i la β -oxidació i d'un descens de l'estrès oxidatiu i la inflamació. PGC-1 β podria tenir un paper clau en aquestes accions mitjançant l'estimulació de la funció dels mitocondris. PGC-1 β s'ha descrit que augmenta la lipogènesi a través de l'activació de SREBP-1c en resposta a un excés d'ingesta d'energia (Lin *et al.* 2005). No obstant, en el present estudi no es va produir un increment de la lipogènesi, malgrat l'estimulació de PGC-1 β en resposta al tractament amb E2. Per altra banda, s'ha vist que els estrògens protegeixen de l'acumulació intrahepàtica de lípids en rates OVX a través del restabliment dels nivells de SREBP-1c (Paquette *et al.* 2008). Per tant, és possible considerar que la senyalització de l'E2 evita l'augment de la lipogènesi hepàtica, tot i l'increment de PGC-1 β .

En conjunt, aquests resultats demostren que l'E2 indueix la funció i la biogènesi mitocondrials als hepatòcits, mitjançant un augment del contingut mitocondrial i de la capacitat oxidativa. Com a resultat, el contingut intrahepàtic de lípids disminueix i es redueixen l'estrès oxidatiu i la inflamació del fetge. Per tant, aquesta hormona podria contribuir de manera molt important al dimorfisme sexual en la funció i la biogènesi mitocondrials que prèviament hem descrit al fetge de rata. A més, aquest estudi aporta evidències que PGC-1 β pren part important en la modulació d'aquests efectes, i sembla ser més susceptible a respondre a l'entorn hormonal que no pas PGC-1 α . Atès que PGC-1 β modula els efectes beneficiosos de l'E2 sobre la funció i la biogènesi mitocondrials, aquest coactivador podria esdevenir especialment rellevant com a diana terapèutica per fer front als desordres mitocondrials hepàtics.

4.2. Efectes dels estrògens sobre la regulació de l'esteatosi hepàtica, i la seva relació amb la modulació de la funció i la biogènesi mitocondrials i la resistència a la insulina hepàtiques en un entorn lipotòxic

Amb l'objectiu d'investigar la implicació de l'E2 en la regulació del metabolisme lipídic, la funció i la biogènesi mitocondrials, i la resistència hepàtica a la insulina en una situació de lipotoxicitat, es van utilitzar models *in vivo* i *in vitro* d'inducció d'esteatosi hepàtica. Així, es van usar rates Wistar d'ambdós sexes alimentades amb una dieta hiperlipídica (HFD), i cèl·lules HepG2 tractades amb palmitat (PA) i E2.

4.2.1. Caracterització dels models experimentals

Pes corporal, índex d'adipositat i paràmetres circulants

L'alimentació amb la HFD va provocar un augment del pes corporal i de l'adipositat en ambdós sexes (taula 10), tot i que l'increment d'aquest darrer paràmetre va ser més manifest als mascles (97%) que a les femelles (44%). El tractament dietètic també va provocar un empitjorament del perfil lipídic circulant especialment a les rates mascle. Així, la trigliceridèmia i els nivells sèrics de LDL-c van augmentar de manera més acusada a les rates mascle, mentre que els NEFAs i el colesterol total es van incrementar només en aquest sexe. A més, el HDL-c únicament va disminuir als mascles.

Taula 10. Efecte de la HFD sobre el pes corporal, l'índex d'adipositat i els paràmetres circulants a rates mascle i femella.

		Control	HFD	ANOVA
Pes corporal (g)	Mascle	450 ± 15	503 ± 16 ^b	S, D
	Femella	241 ± 4 ^a	277 ± 16 ^{ab}	
Índex d'adipositat (%)	Mascle	6,08 ± 0,02	12,0 ± 0,6 ^b	S, S*D
	Femella	6,63 ± 0,62	9,52 ± 0,91 ^{ab}	
TG (mg/dl)	Mascle	197 ± 15	314 ± 12 ^b	S, D, S*D
	Femella	172 ± 14	229 ± 17 ^{ab}	
NEFAs (mM)	Mascle	0,55 ± 0,05	0,73 ± 0,01 ^b	D, S*D
	Femella	0,61 ± 0,02	0,60 ± 0,03 ^a	
Colesterol total (mM)	Mascle	2,03 ± 0,12	2,67 ± 0,13 ^b	S, D, S*D
	Femella	1,79 ± 0,13	1,93 ± 0,08 ^a	
LDL-c (mM)	Mascle	0,24 ± 0,04	0,52 ± 0,06 ^b	D, S*D
	Femella	0,27 ± 0,02	0,34 ± 0,03 ^{ab}	
HDL-c (mM)	Mascle	0,69 ± 0,02	0,44 ± 0,07 ^b	S, S*D
	Femella	0,73 ± 0,07	0,76 ± 0,05 ^a	

L'índex d'adipositat és la suma dels pesos dels dipòsits adiposos blancs gonadal, retroperitoneal i mesentèric relativa a 100 g de pes corporal. HFD, dieta hiperlipídica; TG, triglicèrids; NEFAs, àcids grassos no esterificats; LDL-c, colesterol unit a lipoproteïnes de baixa densitat; HDL-c, colesterol unit a lipoproteïnes d'alta densitat. Els valors s'expressen com a mitjana ± error estàndard de 7 animals per grup. ANOVA ($p < 0.05$): S, efecte sexe; D, efecte HFD; S*D, efecte interactiu sexe i HFD. Post-hoc (t-test, $p < 0.05$): a, femelles vs mascles; b, HFD vs control.

Composició lipídica a fetge de rata i a cèl·lules HepG2

La ingesta de la HFD va incrementar el pes del fetge únicament a les rates mascle (taula 11), mentre que el pes específic del teixit es va mantenir als mascles i va disminuir a les femelles. A més, la HFD va suposar un augment del contingut total de lípids, de TG i de colesterol hepàtics en ambdós sexes; no obstant això, els canvis van ser més acusats als mascles, i els NEFAs només es van incrementar en aquest sexe.

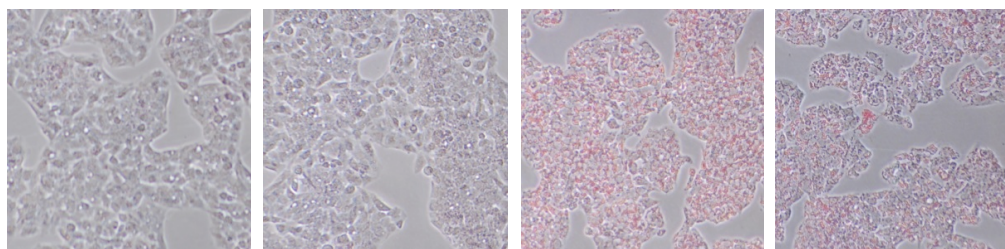
Taula 11. Efecte de la HFD sobre el pes del fetge i la composició lipídica hepàtica a rates mascle i femella.

		Control	HFD	ANOVA
Pes fetge (g)	Mascle	12,5 ± 0,3	14,0 ± 0,2 ^b	S, D, S*D
	Femella	7,27 ± 0,14 ^a	6,98 ± 0,20 ^a	
Pes específic fetge (g/100 g PC)	Mascle	2,88 ± 0,05	2,83 ± 0,05	S, D, S*D
	Femella	2,88 ± 0,06	2,54 ± 0,07 ^{ab}	
Contingut lipídic (mg/g teixit)	Mascle	26,0 ± 0,9	52,8 ± 5,8 ^b	S, D, S*D
	Femella	24,7 ± 1,2	31,5 ± 2,9 ^{ab}	
TG (mg/g teixit)	Mascle	16,2 ± 2,1	49,8 ± 3,2 ^b	S, D, S*D
	Femella	19,0 ± 0,4	25,3 ± 0,6 ^{ab}	
NEFAs (µmols/g teixit)	Mascle	0,49 ± 0,07	0,77 ± 0,06 ^b	D, S*D
	Femella	0,58 ± 0,06	0,57 ± 0,04 ^a	
Colesterol total (mg/g teixit)	Mascle	4,40 ± 0,39	13,9 ± 1,3 ^b	S, D, S*D
	Femella	5,30 ± 0,23	7,38 ± 0,15 ^{ab}	

HFD, dieta hiperlipídica; PC, pes corporal; TG, triglicèrids; NEFAs, àcids grassos no esterificats. Els valors s'expressen com a mitjana ± error estàndard de 7 animals per grup. ANOVA ($p < 0,05$): S, efecte sexe; D, efecte HFD; S*D, efecte interactiu sexe i HFD. Post-hoc (t-test, $p < 0,05$): a, femelles vs mascles; b, HFD vs control.

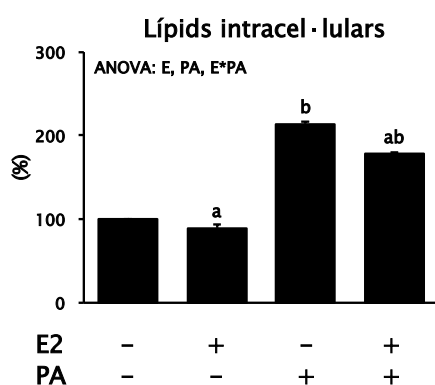
Com era d'esperar, el tractament amb PA va incrementar el contingut intracel·lular de lípids a les cèl·lules HepG2 (figs. 27A i 27B). En presència d'E2, aquest increment va ser menor. La viabilitat cel·lular no es va veure afectada pel tractament amb E2 (fig. 27C), mentre que l'exposició al PA la va reduir en un 15%, resultat similar a l'obtingut en altres estudis (Rojas *et al.* 2014).

A



E2	-	+	-	+
PA	-	-	+	+

B



C

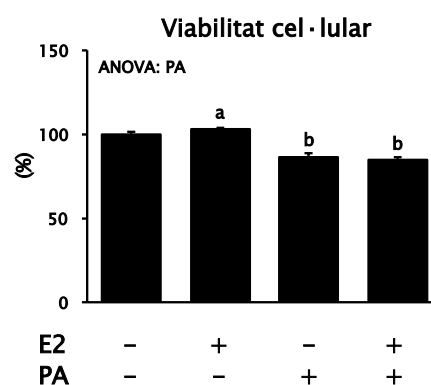


Figura 27. Efecte del PA i l'E2 sobre l'acumulació lipídica (A i B) i la viabilitat cel·lular (C) a cèl·lules HepG2. Les cèl·lules van ser tractades amb PA (0,75 mM), combinat amb E2 (100 nM) o vehicle (etanol) durant 24h. Les cèl·lules control van ser tractades amb el vehicle del PA (BSA). L'acumulació de lípids es va avaluar mitjançant la tinció Oil Red O, i les imatges de microscòpia es van recollir a una magnificació 100X. La viabilitat cel·lular es va determinar mitjançant la tinció amb cristall violeta. E2, 17 β -estradiol; PA, palmitat. Els valors s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de tres experiments duts a terme per duplicat (n=6). ANOVA (p<0,05): E, efecte E2; PA, efecte PA; E*PA, efecte interactiu E2 i PA. Post-hoc (t-test, p<0,05): a, E2 vs vehicle; b, PA vs BSA.

4.2.2. Paper de l'AMPK com a intermediari en les accions de l'E2 sobre el metabolisme lipídic hepàtic

En una situació de lipotoxicitat, interessava analitzar els efectes que exerceix l'E2 sobre l'expressió de gens implicats al metabolisme lipídic hepàtic i investigar el paper de l'AMPK en aquestes accions de l'hormona. L'AMPK constitueix un important sensor energètic cel·lular al fetge, que estimula les vies catabòliques i inhibeix les anabòliques, restaurant el balanç energètic (Viollet *et al.* 2009). D'aquesta manera, podria esdevenir un element clau en les accions de l'E2 sobre el metabolisme lipídic hepàtic. Per dur a terme l'estudi es van emprar rates d'ambdós sexes alimentades amb dieta hiperlipídica (HFD), així com cèl·lules HepG2 exposades a palmitat (PA) i E2. El possible paper mediador d'AMPK en les accions de PA i E2 es va examinar a les cèl·lules HepG2 mitjançant l'ús del compost C, un inhibidor d'AMPK.

4.2.2.1. Resultats

Nivells de mRNA de marcadors del metabolisme lipídic a fetge de rata i a cèl·lules HepG2

Les rates femella control, en comparació a les mascles, van presentar nivells majors de mRNA de CD36 i MTP, i menors de SREBP-1c, PPAR γ i MCAD (fig. 28). El tractament dietètic va provocar un augment de l'expressió de PPAR α , CPT1A i MCAD només a les rates femelles. Per la seva banda, als mascles va suposar la disminució de l'expressió de FABP1 i l'augment de la de PPAR γ .

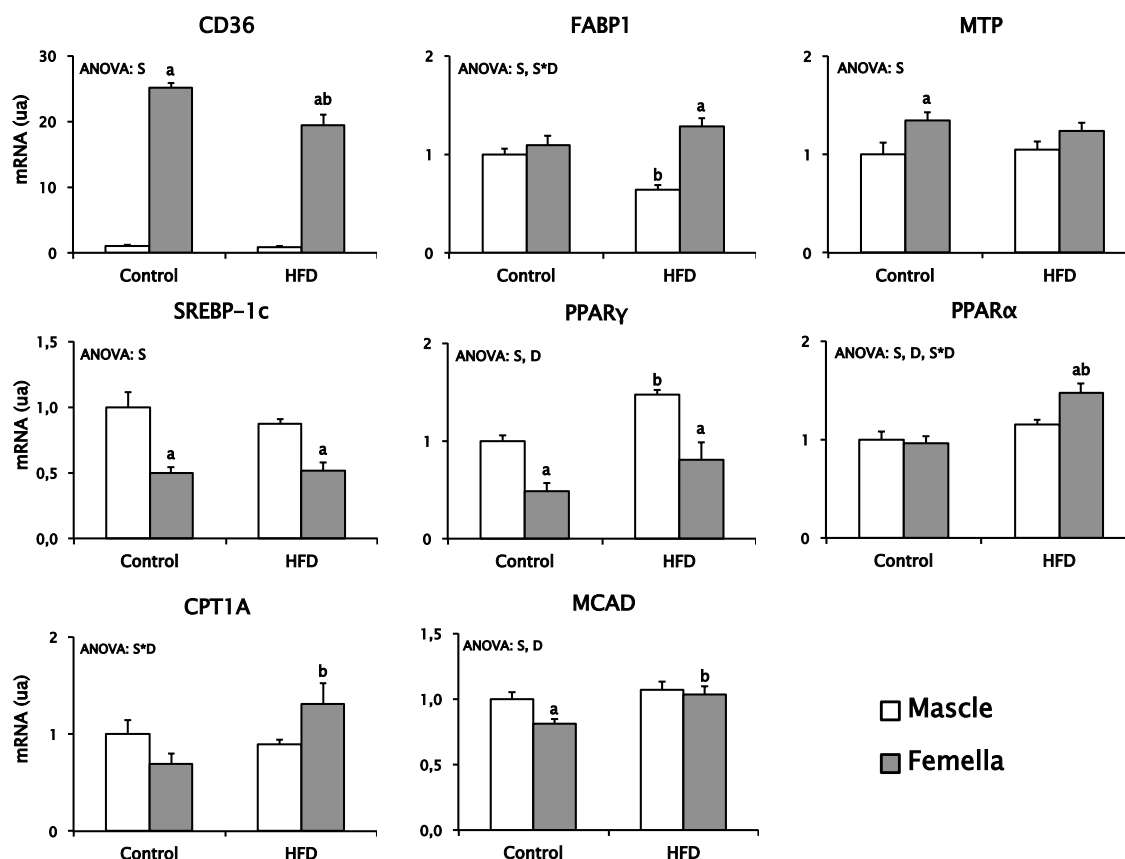


Figura 28. Efecte de la HFD sobre els nivells de mRNA de marcadors del metabolisme lipídic al fetge de rates mascle i femella. Els nivells de mRNA s'expressen en unitats arbitràries (ua). HFD, dieta hiperlipídica; CD36, translocasa d'àcids grassos; FABP1, proteïna 1 d'unió a àcids grassos; MTP, proteïna de transferència de triacilglicerols microsomal; SREBP-1c, proteïna 1c d'unió a elements reguladors d'esterols; PPAR γ , receptor activat per proliferadors peroxisomals γ ; PPAR α , receptor activat per proliferadors peroxisomals α ; CPT1A, transferasa 1A de palmitoilcarnitina; MCAD, deshidrogenasa d'àcils-CoA de cadena mitjana. Els valors s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de 7 animals per grup. ANOVA ($p < 0,05$): S, efecte sexe; D, efecte HFD; S*D, efecte interactiu sexe i HFD. Post-hoc (t-test, $p < 0,05$): a, femelles vs mascles; b, HFD vs control.

L'E2 va incrementar l'expressió de CD36 a les cèl·lules HepG2 (fig. 29A). Els nivells de mRNA d'aquesta proteïna, a més dels de FATP2 i FABP1, també van augmentar en resposta a l'exposició al PA. A més, la combinació d'ambdós tractaments va estimular encara més les vies de captació i transport de NEFAs, evidenciat per l'augment de l'expressió de FATP2 i FABP1. Pel que fa a la secreció de VLDL (fig. 29A), els nivells de mRNA de MTP van augmentar en resposta a l'E2, al PA i a la combinació d'ambdós tractaments. Referent a la lipogènesi (fig. 29B), l'exposició al PA va suposar l'increment dels nivells de mRNA de SREBP-

1c i FAS, mentre que la combinació de PA amb E2 va recuperar els valors de SREBP-1c al nivell control. Finalment, l'oxidació d'àcids grassos es va activar en resposta a l'E2 i al PA (fig. 29C), com indica l'augment dels nivells de mRNA de PPAR α , CPT1A, MCAD i ACOX. Aquests marcadors es van incrementar encara més quan es combinaren PA i E2.

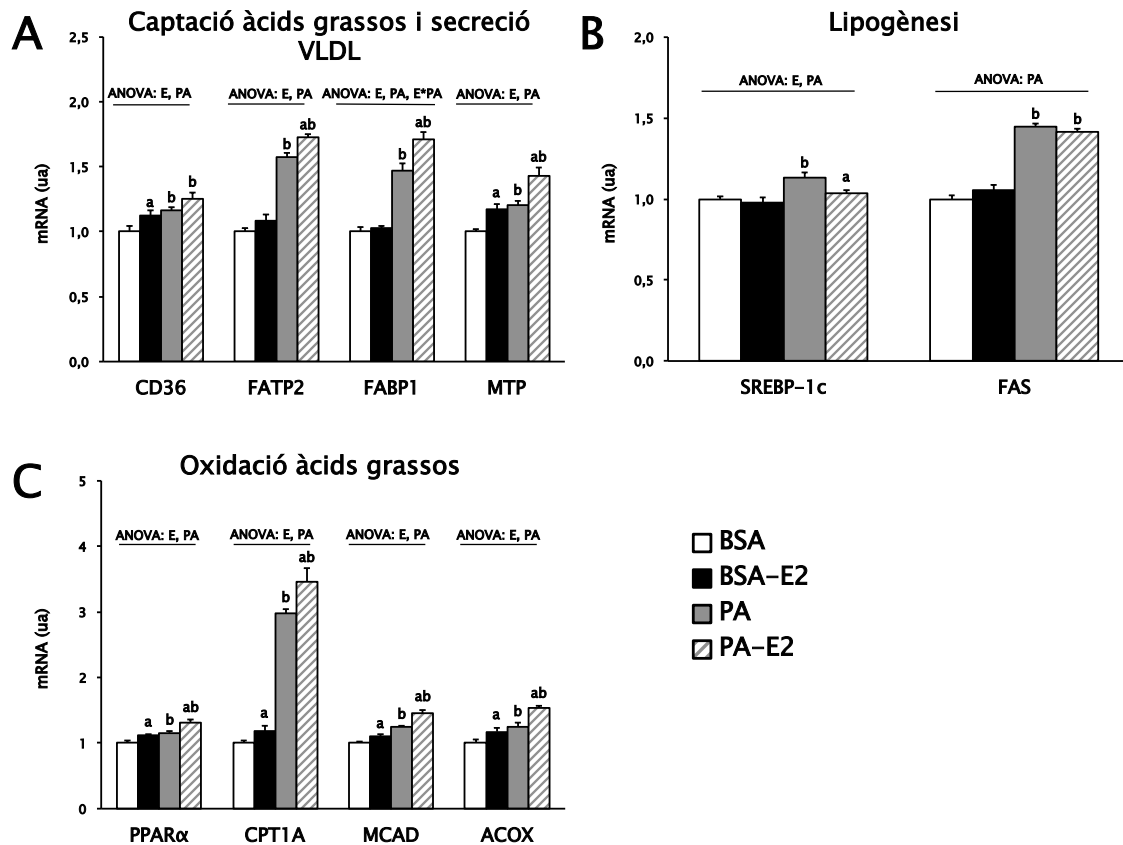


Figura 29. Efecte del PA i l'E2 sobre els nivells de mRNA de marcadors del metabolisme lipídic a cèl·lules HepG2: captació d'àcids grassos i secreció de VLDL (A), lipogènesi (B) i oxidació d'àcids grassos (C). Les cèl·lules van ser tractades amb PA (0,75 mM), combinat amb E2 (100 nM) o vehicle (etanol) durant 24h. Les cèl·lules control van ser tractades amb el vehicle del PA (BSA). Els nivells de mRNA s'expressen en unitats arbitràries (ua). E2, 17 β -estradiol; PA, palmitat; CD36, translocasa d'àcids grassos; FATP2, proteïna transportadora 2 d'àcids grassos; FABP1, proteïna 1 d'unió a àcids grassos; MTP, proteïna de transferència de triacilglicerols microsomal; SREBP-1c, proteïna 1c d'unió a elements reguladors d'esterols; FAS, àcid gras sintasa; PPAR α , receptor activat per proliferadors peroxisomals α , CPT1A, transferasa 1A de palmitoïlcarnitina; MCAD, deshidrogenasa d'acil-CoA de cadena mitjana; ACOX, acil-CoA oxidasa 1. Els valors s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de tres experiments duts a terme per duplicat (n=6). ANOVA (p<0,05): E, efecte E2; PA, efecte PA; E*PA, efecte interactiu E2 i PA. Post-hoc (t-test, p<0,05): a, E2 vs vehicle; b, PA vs BSA.

Activació d'AMPK a fetge de rata i a cèl·lules HepG2 tractades amb compost C

L'alimentació amb la HFD va incrementar l'activació d'AMPK només a les rates femella (fig. 30). A les cèl·lules HepG2, el tractament combinat de PA i E2 va augmentar l'activació d'AMPK, resposta atenuada per l'ús del compost C, un inhibidor d'AMPK (fig. 31).

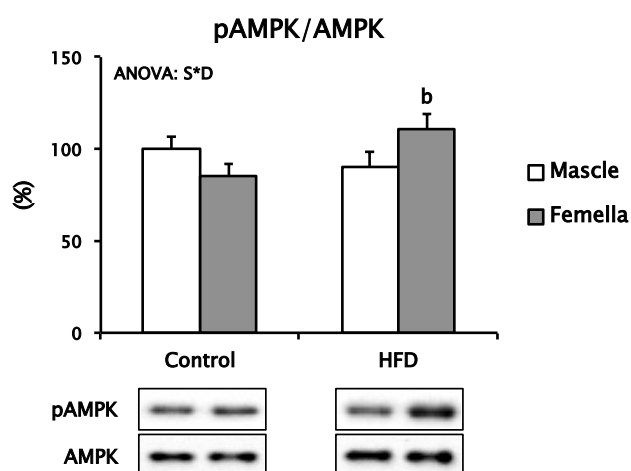


Figura 30. Efecte de la HFD sobre l'activació d'AMPK al fetge de rates mascle i femella. Els nivells proteics de pAMPK s'han normalitzat per la intensitat de AMPK. HFD, dieta hiperlipídica; AMPK, cinasa activada per AMP. Els valors s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de 7 animals per grup. ANOVA ($p < 0,05$): S, efecte sexe; D, efecte HFD; S*D, efecte interactiu sexe i HFD. Post-hoc (t-test, $p < 0,05$): a, femelles vs mascles; b, HFD vs control.

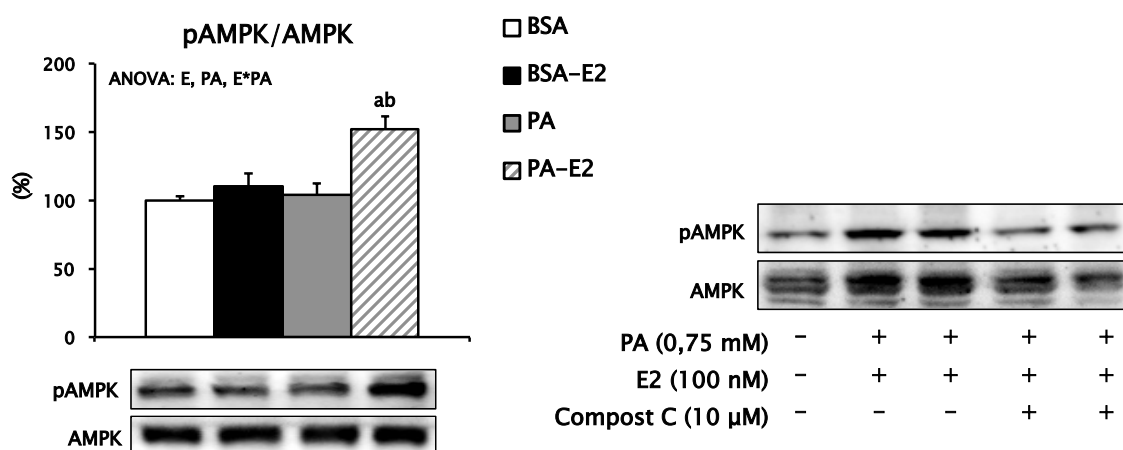


Figura 31. Efecte del PA i l'E2, i del compost C sobre l'activació d'AMPK a cèl·lules HepG2. Les cèl·lules van ser tractades amb PA (0,75 mM), combinat amb E2 (100 nM) o vehicle (etanol) durant 24h. Les cèl·lules control van ser tractades amb el vehicle del PA (BSA). El compost C (10 μ M) s'afegí 1h abans dels respectius tractaments i es va mantenir durant les 24h. Els nivells proteics de pAMPK s'han normalitzat per la intensitat d'AMPK. E2, 17 β -estradiol; PA, palmitat; AMPK, cinasa activada per AMP. Els valors s'expressen com a mitjana \pm error

estàndard de tres experiments duts a terme per duplicat (n=6). ANOVA ($p < 0,05$): E, efecte E2; PA, efecte PA; E*PA, efecte interactiu E2 i PA. Post-hoc (t-test, $p < 0,05$): a, E2 vs vehicle; b, PA vs BSA.

Acumulació lipídica i viabilitat a cèl·lules HepG2 tractades amb compost C

L'administració del compost C va augmentar la deposició intracel·lular de lípids en tots els tractaments (figs. 32A i 32B). Com era d'esperar, aquesta acumulació lipídica es va incrementar notablement en resposta al PA, inducció que no es va alterar amb la combinació amb E2. L'inhibidor d'AMPK va disminuir la viabilitat cel·lular, però no modificà el perfil obtingut en resposta a cada tractament (fig. 32C).

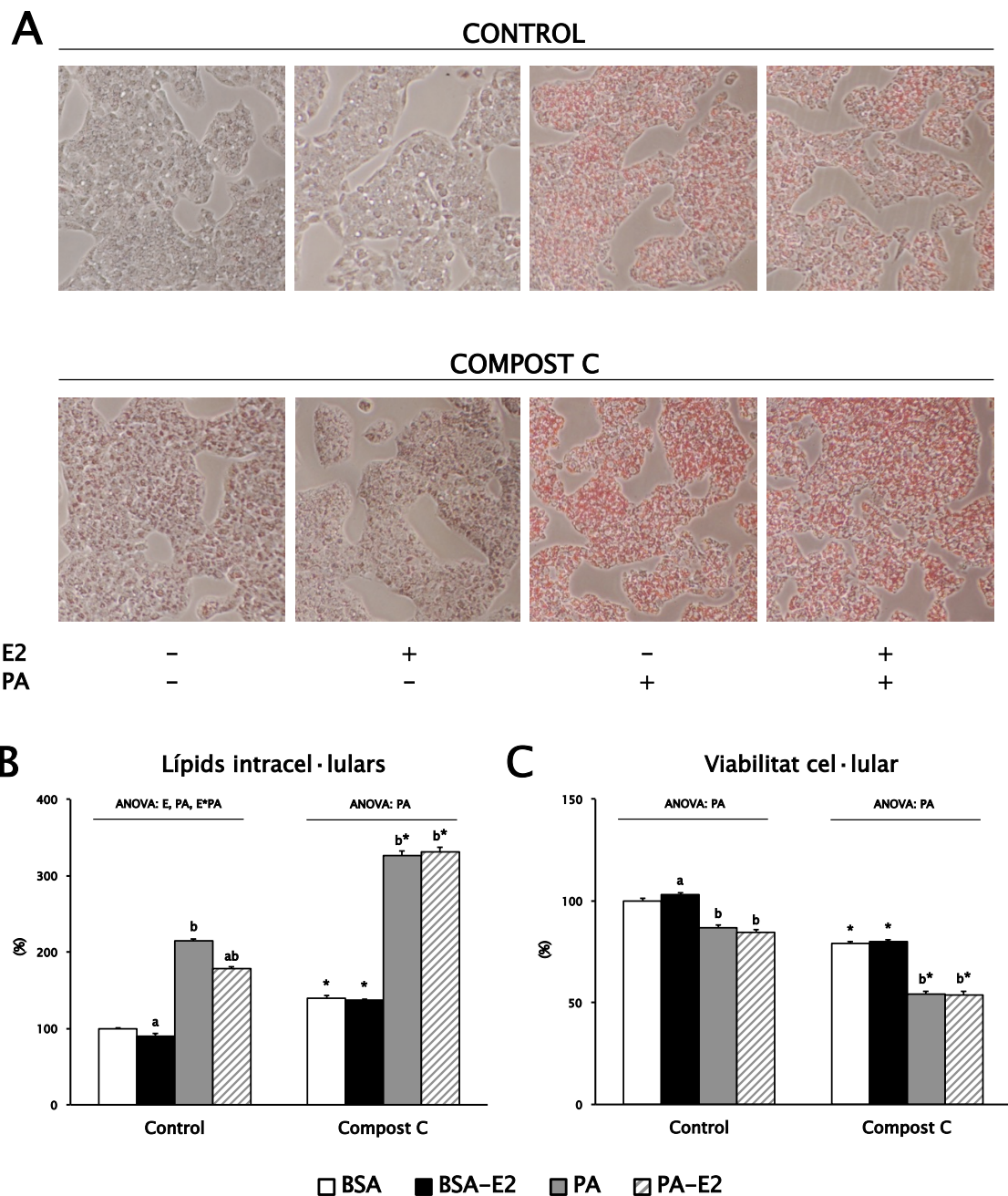


Figura 32. Efecte del compost C sobre l'acumulació lipídica (A i B) i la viabilitat cel·lular (C) a cèl·lules HepG2 tractades amb PA i E2. Les cèl·lules van ser tractades amb PA (0,75 mM), combinat amb E2 (100 nM) o vehicle (etanol) durant 24h. Les cèl·lules control van ser tractades amb el vehicle del PA (BSA). El compost C (10 μ M) s'afegí 1h abans dels respectius tractaments i es va mantenir durant les 24h. L'acumulació de lípids es va avaluar mitjançant la tinció Oil Red O, i les imatges de microscòpia es van recollir a una magnificació 100X. La viabilitat cel·lular es va determinar mitjançant la tinció amb cristall violeta. E2, 17 β -estradiol; PA, palmitat. Els valors s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de tres experiments duts a terme per duplicat (n=6). ANOVA (p<0,05): E, efecte E2; PA, efecte PA; E*PA, efecte interactiu E2 i PA. Post-hoc (t-test, p<0,05): a, E2 vs vehicle; b, PA vs BSA. Test t de Student (p<0,05): *, compost C vs control.

Metabolisme lipídic a cèl·lules HepG2 tractades amb compost C

El metabolisme lipídic de les cèl·lules HepG2 tractades amb PA i E2 es va modificar amb l'administració del compost C. Així, l'expressió dels gens MTP (fig. 33A), PPAR α (fig. 33C) i MCAD (fig. 33E) va disminuir, mentre que la de SREBP-1c (fig. 33B) va augmentar. No obstant, es van perdre els efectes que havien provocat el PA i l'E2 sobre aquests marcadors. Els nivells de mRNA de CPT1A (fig. 33D) i d'ACOX (fig. 33F) van augmentar en resposta al PA, però no es van alterar per efecte de l'E2.

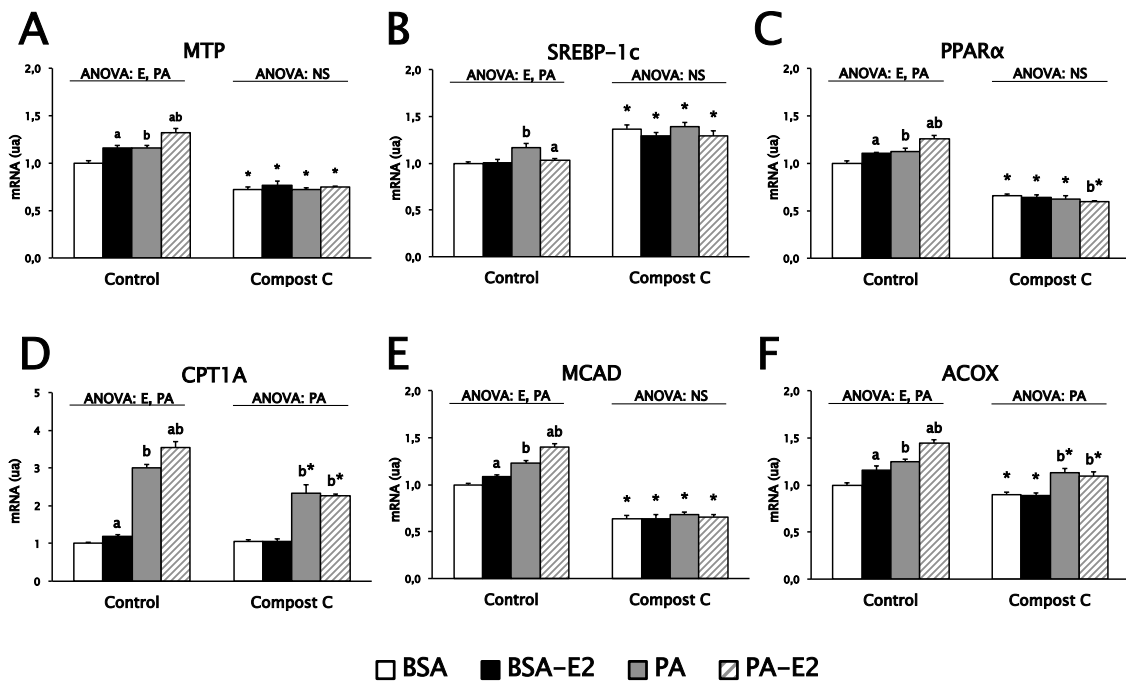


Figura 33. Efecte del compost C sobre els nivells de mRNA de gens implicats al metabolisme lipídic a cèl·lules HepG2 tractades amb PA i E2 (A-F). Les cèl·lules van ser tractades amb PA (0,75 mM), combinat amb E2 (100 nM) o vehicle (etanol) durant 24h. Les cèl·lules control van ser tractades amb el vehicle del PA (BSA). El compost C (10 μ M) s'afegí 1h abans dels respectius tractaments i es va mantenir durant les 24h. Els nivells de mRNA s'expressen en unitats arbitràries (ua). E2, 17 β -estradiol; PA, palmitat; MTP, proteïna de transferència de triacilglicerols microsomal; SREBP-1c, proteïna 1c d'unió a elements reguladors d'esterols; PPAR α , receptor activat per proliferadors peroxisomals α ; CPT1A, transferasa 1A de palmitoïlcarnitina; MCAD, deshidrogenasa d'acils-CoA de cadena mitjana; ACOX, acil-CoA oxidasa 1. Els valors s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de tres experiments duts a terme per duplicat (n=6). ANOVA ($p < 0,05$): E, efecte E2; PA, efecte PA; E*PA, efecte interactiu E2 i PA; NS, cap efecte significatiu. Post-hoc (t-test, $p < 0,05$): a, E2 vs vehicle; b, PA vs BSA. Test t de Student ($p < 0,05$): *, compost C vs control.

4.2.2.2. Discussió

En aquest estudi hem evidenciat un dimorfisme sexual en els efectes de l'alimentació amb una HFD, de manera que l'augment de la lipèmia i de l'acumulació de lípids al fetge induïda per la dieta ha estat més accentuada a les rates mascle que a les femella. Els estudis desenvolupats en cèl·lules HepG2 tractades amb PA i E2 ens han permès donar una passa cap a l'enteniment dels processos moleculars responsables d'aquestes diferències entre sexes. Així, l'E2 disminuiria l'acumulació de lípids intrahepàtics intervenint en la regulació de l'expressió de gens que controlen el metabolisme lipídic. D'altra banda, els resultats obtinguts han posat de manifest que aquests efectes hepatoprotectors de l'E2 en una situació lipotòxica serien mediat, almenys en part, a través de l'acció d'AMPK.

La hiperlipèmia induïda per la ingesta de la HFD va ser més manifesta a les rates mascle que a les femella, i associat a aquest excés de lípids circulants, es va incrementar l'acumulació de greix al fetge. El major grau d'esteatosi hepàtica a les rates mascle es pot atribuir a la major captació i deposició d'àcids grassos circulants en teixits on habitualment no s'hi acumulen, com és el cas del fetge, i amb l'alteració del metabolisme lipídic del teixit (Yu *et al.* 2016), tal i com es veu reflectit als resultats del present estudi. Així, els nivells de mRNA de gens implicats en el desenvolupament d'esteatosi hepàtica, tals com SREBP-1c i PPAR γ (Videla & Pettinelli 2012), van ser majors a les rates mascle tant en situació control com en resposta a la HFD. Per contra, la ingesta de la HFD va provocar a les rates femella un augment de l'expressió de PPAR α i dels seus gens dianes CPT1A i MCAD, promovent d'aquesta manera la utilització dels àcids grassos i la β -oxidació. Tenint en compte les accions d'aquests factors sobre el metabolisme lipídic hepàtic, s'ha descrit que un augment del rati SREBP-1c/PPAR α està associat amb el desenvolupament d'esteatosi al fetge (Pettinelli *et al.* 2009). Els nostres resultats mostren que, amb l'alimentació amb la HFD,

el rati SREBP-1c/PPAR α és menor a les rates femella en comparació a les mascles ($0,57 \pm 0,08$ vs $0,95 \pm 0,13$, $p < 0,05$), la qual cosa suggereix que al sexe femení l'oxidació d'àcids grassos està afavorida sobre la seva formació. Així doncs, sembla que les rates femella podrien fer front a la sobrecàrrega de NEFAs d'una manera més efectiva que els mascles, mitjançant l'activació de l'oxidació, fet que conduiria a l'atenuació de l'esteatosi al fetge. Aquesta idea també està d'acord amb el fet que, durant la progressió del fetge gras, es posen en funcionament estratègies metabòliques per frenar l'acumulació de greix en aquest teixit, com l'estimulació de l'oxidació dels àcids grassos (Begrache *et al.* 2013).

Per tal d'avaluar el paper de les hormones sexuals, i en concret de l'E2, en la regulació del metabolisme lipídic al fetge i en la millora de l'esteatosi, vam dur a terme estudis en hepatòcits HepG2 tractats amb PA i E2. De manera similar al que havíem observat en els estudis *in vivo* amb la HFD, el tractament de les cèl·lules HepG2 amb PA va alterar el metabolisme lipídic, donant lloc a una major acumulació intracel·lular de lípids. Tot i l'augment de l'expressió de gens involucrats en l'oxidació d'àcids grassos (PPAR α , CPT1A, MCAD i ACOX) i en la secreció de VLDL (MTP), el tractament amb PA també va incrementar els nivells de mRNA dels gens responsables de la captació i trànsit de NEFAs (CD36, FATP2 i FABP1) i de la lipogènesi (SREBP-1c i FAS). En conjunt, aquestes respostes no van resultar efectives per combatre la sobrecàrrega excessiva de PA a les cèl·lules, resultant en una notable acumulació de lípids als hepatòcits.

És interessant destacar que el tractament dels hepatòcits HepG2 amb E2 va revertir parcialment l'esteatosi provocada pel PA. Concretament, els nivells de mRNA de gens implicats al metabolisme lipídic suggereixen que aquest efecte de l'E2 podria venir donat per una activació de l'oxidació dels NEFAs (PPAR α , CPT1A, MCAD i ACOX) i de la secreció de VLDL (MTP), a més d'una supressió de la lipogènesi (SREBP-1c). La reducció del contingut lipídic va ocórrer malgrat l'augment de

l'expressió de gens implicats en la captació i trànsit de NEFAs (CD36, FATP2 i FABP1). Els experiments amb animals també havien mostrat un augment considerable de proteïnes involucrades en aquests processos en el cas de les femelles, sobretot de CD36. De fet, s'ha descrit una major expressió de CD36 a femelles en comparació a mascles, tant a rosegadors com a humans, contribuint a la idea que les femelles estan més preparades per a la captació i utilització dels NEFAs en situacions d'augment de la disponibilitat d'àcids grassos circulants (Ståhlberg *et al.* 2004). D'acord amb això, cal recordar que les rates femella van mantenir els nivells circulants de NEFAs en resposta al consum de la HFD, efecte que podria estar afavorit per la major captació d'aquests metabòlits pel fetge. A més, els processos metabòlics implicats en la utilització dels NEFAs al fetge es van activar a les femelles, contribuint així a la menor acumulació de lípids observada en aquest teixit en comparació als mascles. A més, FABP1 no només intervé en la captació i acumulació de NEFAs als hepatòcits, sinó que aquesta proteïna també s'associa al transport dels NEFAs cap als mitocondris i als peroxisomes per a la seva utilització, o cap al nucli amb el fi d'activar PPAR α (Atshaves *et al.* 2010). Així, la major expressió de FABP1 podria facilitar també una utilització més efectiva dels NEFAs en aquest sexe.

Per tant, les rates femella presenten una menor acumulació hepàtica de lípids en resposta a la ingesta d'una HFD, que pot ser explicada, almenys en part, per un maneig més efectiu dels NEFAs. A més, els resultats derivats dels estudis a HepG2 donen suport a la idea que l'E2 exerceix una regulació positiva del metabolisme lipídic que resulta en la reducció de l'acumulació de lípids als hepatòcits. Concretament, aquests efectes de l'E2 vendrien determinats per un augment de la utilització dels NEFAs i de la secreció de VLDL, i per una disminució de la lipogènesi. Els nostres estudis previs en rates ovariectomitzades (veure figura 20 i taules 5 i 7, apartat 4.1.) recolzen aquestes dades, atès que la manca d'estrògens es relaciona amb l'acumulació de TG al fetge, mentre que la suplementació amb E2 suposa el restabliment dels nivells

de TG hepàtics als valors controls a través de l'activació del metabolisme oxidatiu i de la disminució de l'expressió dels gens lipogènics SREBP-1c i PPAR γ .

L'AMPK és una proteïna cinasa que actua com a sensor de l'estat energètic de la cèl·lula (Viollet *et al.* 2009). Com succeeix a la majoria de teixits i òrgans, al fetge, i en situacions de privació d'energia, l'AMPK estimula les vies catabòliques i inhibeix les anabòliques, amb el fi de generar o preservar l'ATP (Viollet *et al.* 2009). Per això, l'activació d'AMPK ha estat focus d'atenció en els darrers anys en la lluita contra l'esteatosi hepàtica (Smith *et al.* 2016). En resposta a la HFD, únicament les rates femella van activar l'AMPK, constituint una possible estratègia per mitigar l'excessiva acumulació de lípids al fetge en aquest sexe. A més, els hepatòcits HepG2 sotmesos al tractament amb PA, van mostrar un augment considerable (d'un 50%) de la fosforilació d'AMPK quan les cèl·lules es van tractar amb E2. Aquest efecte hormonal es veu recolzat pels nostres resultats obtinguts en rates OVX (veure taula 7 i figura 23, apartat 4.1.) i altres estudis, on s'ha comprovat que l'E2 modula l'activació d'aquesta proteïna cinasa (Nigro *et al.* 2014b; Galmés-Pascual *et al.* 2017). Així doncs, els efectes de l'E2 sobre la regulació de les vies metabòliques que condueixen a la disminució de l'acumulació de lípids intrahepàtics podrien ser explicats per la capacitat d'aquesta hormona d'activar l'AMPK hepàtica. Per dilucidar aquesta idea, vam tractar les cèl·lules HepG2 amb el compost C, un inhibidor d'AMPK. Els resultats obtinguts van posar de manifest que l'E2 milloraria l'esteatosi hepàtica a través de l'activació d'AMPK. En aquest sentit, la inhibició d'aquesta cinasa va augmentar la concentració intracel·lular de lípids, i es va perdre la reversió que havia provocat l'E2. A més, es va suprimir l'acció de l'hormona sobre la regulació del metabolisme lipídic, suggerint que l'acció beneficiosa de l'hormona aniria lligada a la funció d'AMPK. D'acord amb estudis previs que descriuen que l'activitat d'AMPK reprimeix l'expressió de SREBP-1c (Li *et al.* 2011), en el nostre estudi vam comprovar com els nivells de mRNA d'aquest gen

augmentaren quan es va inhibir l'AMPK. A més, no es va produir la reversió de l'expressió de SREBP-1c que havíem observat als hepatòcits tractats amb E2 en condicions lipotòxiques, suggerint que l'acció de l'hormona reduint la lipogènesi es veu limitada quan l'AMPK es troba inhibida. A més, l'expressió de PPAR α i dels seus gens dianes MTP, CPT1A i ACOX també va disminuir, la qual cosa està d'acord amb l'acció activadora de PPAR α per part d'AMPK (Bronner *et al.* 2004; Tateya *et al.* 2013). Malgrat que el PA va seguir estimulant en part l'oxidació dels NEFAs, tal i com ho suggereix l'augment de l'expressió de CPT1A i ACOX, aquestes respostes no van ser suficients per evitar l'acumulació de lípids als hepatòcits. A més, l'acció estimuladora de l'E2 també va desaparèixer, fet que recolza encara més la necessitat de l'activació d'AMPK per a què l'hormona estimuli la utilització dels NEFAs. A banda d'aquesta regulació transcripcional, l'AMPK també du a terme accions a curt termini sobre l'activitat de varis enzims. Per exemple, l'AMPK inactiva la HMG-CoA i l'ACC a través de la seva fosforilació, inhibint la biosíntesi de colesterol i la d'àcids grassos, respectivament (Viollet *et al.* 2009). Aquesta acció va lligada a la disminució dels nivells de malonil-CoA, fet que comporta un increment de la β -oxidació (Viollet *et al.* 2009). Per tant, no es pot descartar que l'impacte de l'E2 sobre la regulació del metabolisme lipídic estigui també associat a la regulació que exerceix la cinasa sobre l'activitat d'enzims reguladors claus.

En resum, en aquest treball es demostra el paper de l'E2 regulant l'expressió de varis gens implicats al metabolisme lipídic al fetge. Concretament, aquesta hormona participa, d'una banda, en l'activació de gens implicats en l'oxidació d'àcids grassos i en la secreció de VLDL, i d'altra banda, en la inhibició dels gens lipogènics. D'aquesta manera, i en situacions de lipotoxicitat, l'E2 podria minvar l'acumulació de lípids. Aquests resultats aporten evidències dels mecanismes a través dels quals les dones estarien més protegides contra l'esteatosi i la progressió de les patologies associades al fetge. A més, les dades

suggereixen que l'activació d'AMPK es requereix per a què l'hormona dugui a terme aquests efectes.

4.2.3. Implicació de l'E2 en la resistència hepàtica a la insulina en un entorn lipotòxic. Relació amb els efectes de l'hormona sobre la funció i la biogènesi mitocondrials

L'objectiu del present estudi va ser avaluar els efectes de l'E2 sobre la resistència hepàtica a la insulina induïda per la lipotoxicitat i la seva connexió amb la funció i la biogènesi mitocondrials. En concret, es va estudiar la implicació de l'intermediari inflamatori JNK.

Amb aquesta finalitat, es van emprar rates d'ambdós sexes alimentades amb dieta hiperlipídica (HFD), així com cèl·lules HepG2 exposades a palmitat (PA) i E2. Per examinar la resposta tissular a la insulina, es van estimular els animals mitjançant l'administració d'una dosi d'aquesta hormona 20 min abans del seu sacrifici i, en el cas de les cèl·lules HepG2, 15 min abans de la seva recollida.

4.2.3.1. Resultats

Paràmetres circulants de sensibilitat a la insulina i tolerància a la glucosa

Només a les rates mascle, el consum de la HFD va suposar un augment significatiu dels nivells sèrics d'insulina i del valor d'HOMA-IR (taula 12). L'HOMA-IR, utilitzat com a model homeostàtic d'estimació de la resistència a la insulina, es calcula com $[\text{glucèmia en dejú} * \text{insulinèmia en dejú} / 22,5]$. Aquest índex, que ja era notablement major a les rates mascle en condicions d'alimentació estàndard, va augmentar un 92% en resposta a la HFD. Pel que fa a les adipocines, el tractament dietètic va incrementar els nivells sèrics d'adiponectina únicament a les femelles, mentre que la leptinèmia va augmentar de manera més acusada als mascles. L'índex leptina/adiponectina, utilitzat també com a marcador de resistència a la insulina, es va alterar seguint el mateix perfil que l'HOMA-IR, i només va augmentar a les rates mascle en resposta a la HFD (l'increment va ser d'un 118%). A més a més, únicament el grup de

rates mascle HFD va mostrar intolerància a la glucosa (fig. 34), d'acord amb els majors nivells de glucosa a la sang 60 i 120 min després de l'administració de glucosa, en comparació a les rates femella i als seus respectius controls.

Taula 12. Efecte de la HFD sobre paràmetres circulants de sensibilitat a la insulina a rates mascle i femella.

		Control	HFD	ANOVA
Insulina ($\mu\text{g/l}$)	Mascle	0,60 \pm 0,05	0,85 \pm 0,10 ^b	S, S*D
	Femella	0,56 \pm 0,06	0,50 \pm 0,01 ^a	
HOMA-IR	Mascle	6,55 \pm 0,88	12,6 \pm 2,5 ^b	S, D
	Femella	2,46 \pm 0,14 ^a	2,91 \pm 0,21 ^a	
Adiponectina ($\mu\text{g/ml}$)	Mascle	24,0 \pm 1,4	21,3 \pm 1,6	S, D, S*D
	Femella	25,0 \pm 1,7	36,6 \pm 0,6 ^{ab}	
Leptina (ng/ml)	Mascle	9,23 \pm 1,20	23,3 \pm 3,2 ^b	S, D, S*D
	Femella	4,36 \pm 0,90 ^a	7,70 \pm 1,04 ^{ab}	
Leptina/adiponectina (ua)	Mascle	0,49 \pm 0,07	1,07 \pm 0,16 ^b	S, D, S*D
	Femella	0,22 \pm 0,03 ^a	0,28 \pm 0,02 ^a	

HFD, dieta hiperlipídica; HOMA-IR, model homeostàtic d'estimació de la resistència a la insulina; ua, unitats arbitràries. L'HOMA-IR es va calcular com [glucèmia en dejú * insulinèmia en dejú/22,5]. Els valors s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de 7 animals per grup. ANOVA ($p < 0.05$): S, efecte sexe; D, efecte HFD; S*D, efecte interactiu sexe i HFD. Post-hoc (t-test, $p < 0.05$): a, femelles vs mascles; b, HFD vs control.

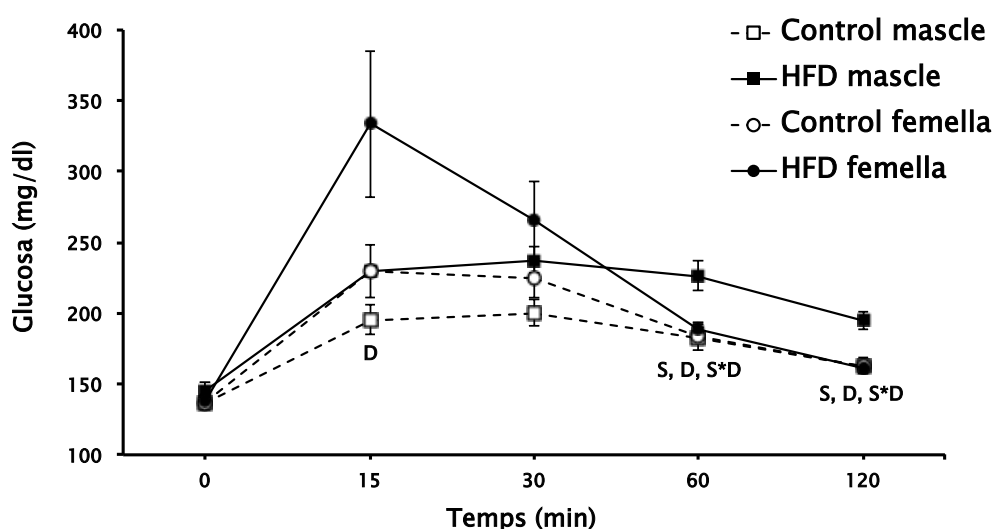


Figura 34. Efecte de la HFD sobre la tolerància a la glucosa a rates mascle i femella. Després de 12h en dejú, els animals van rebre una injecció via intraperitoneal de glucosa (2 g per kg de pes corporal). HFD, dieta hiperlipídica. Els valors s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de 7 animals per grup. ANOVA ($p < 0.05$): S, efecte sexe; D, efecte de la HFD; S*D, efecte interactiu sexe i HFD.

Activació d'Akt i nivells d'APPL1 a fetge de rata i a cèl·lules HepG2

En resposta a la ingesta de la HFD, l'activació d'Akt va disminuir únicament a les rates mascle (fig. 35A). A les cèl·lules HepG2, l'exposició al PA va disminuir l'activació d'Akt (fig. 35B), la qual es va restablir amb el tractament conjunt de PA i E2. A les cèl·lules no tractades amb PA, l'E2 no modificà l'activació d'Akt.

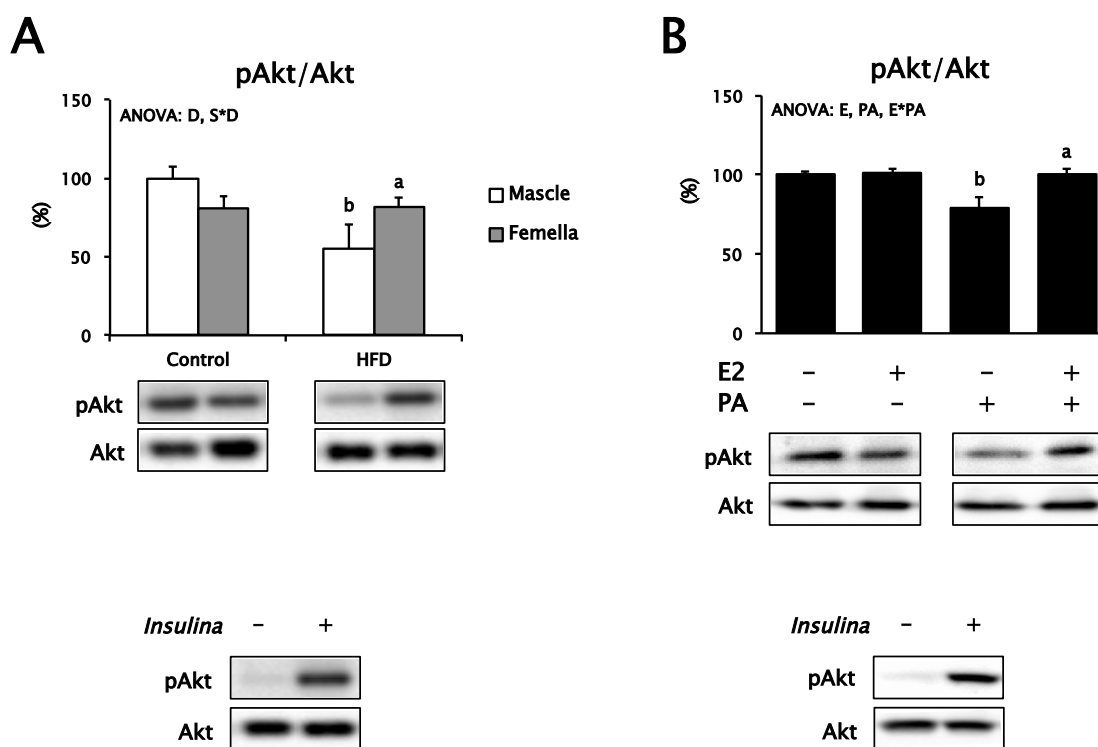


Figura 35. Activació d'Akt al fetge de rates mascle i femella alimentades amb HFD (A) i a cèl·lules HepG2 tractades amb PA i E2 (B). A, les rates van ser tractades amb insulina (5 U/Kg) 20 min abans del sacrifici. B, les cèl·lules van ser tractades amb PA (0,75 mM), combinat amb E2 (100 nM) o vehicle (etanol) durant 24h. Les cèl·lules control van ser tractades amb el vehicle del PA (BSA). Abans de recollir, les cèl·lules es van estimular amb insulina (10 nM) durant 15 min. Els nivells proteics de pAkt s'han normalitzat per la intensitat d'Akt. HFD, dieta hiperlipídica; E2, 17 β -estradiol; PA, palmitat. *In vivo*, els valors s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de 7 animals per grup. ANOVA ($p < 0.05$): S, efecte sexe; D, efecte HFD; S*D, efecte interactiu sexe i HFD. Post-hoc (t-test, $p < 0.05$): a, femelles vs mascles; b, HFD vs control. *In vitro*, els valors s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de tres experiments duts a terme per duplicat ($n = 6$). ANOVA ($p < 0,05$): E, efecte E2; PA, efecte PA; E*PA, efecte interactiu E2 i PA. Post-hoc (t-test, $p < 0,05$): a, E2 vs vehicle; b, PA vs BSA.

De forma similar al que s'ha descrit per l'Akt, la ingesta de la HFD va induir una disminució dels nivells proteics d'APPL1 només a les rates mascle (fig.36A). L'exposició de les cèl·lules HepG2 al PA va provocar també una reducció dels nivells proteics d'APPL1 (fig. 36B), però es van restablir amb la suplementació amb E2.

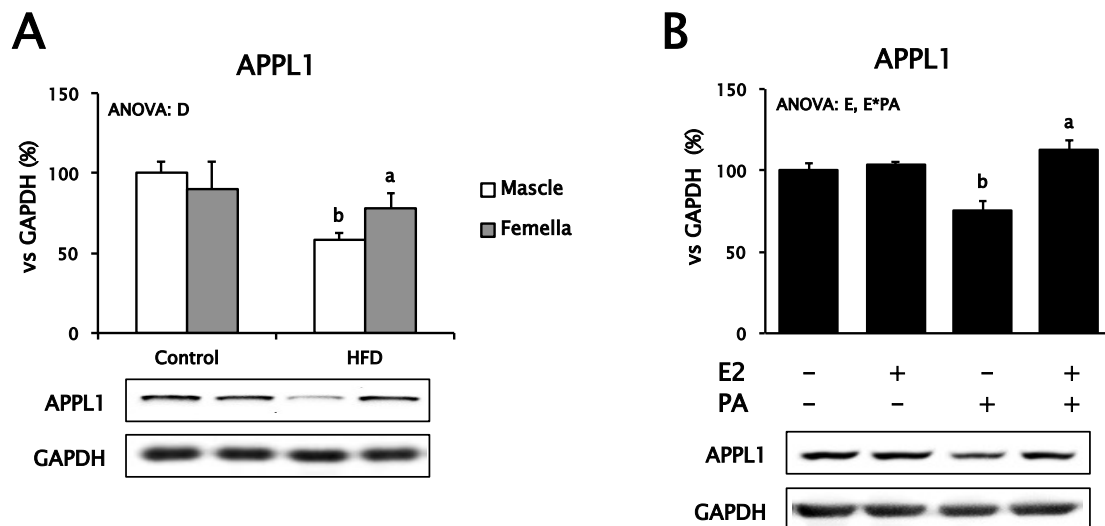


Figura 36. Nivells proteics d'APPL1 al fetge de rates mascle i femella alimentades amb HFD (A) i a cèl·lules HepG2 tractades amb PA i E2 (B). B, les cèl·lules van ser tractades amb PA (0,75 mM), combinat amb E2 (100 nM) o vehicle (etanol) durant 24h. Les cèl·lules control van ser tractades amb el vehicle del PA (BSA). Els nivells proteics d'APPL1 s'han normalitzat per la intensitat de GAPDH. HFD, dieta hiperlipídica; E2, 17 β -estradiol; PA, palmitat; APPL1, proteïna adaptadora 1 que conté una interacció de fosfotirosines, un domini PH i una cremallera de leucina. *In vivo*, els valors s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de 7 animals per grup. ANOVA ($p < 0.05$): S, efecte sexe; D, efecte HFD; S*D, efecte interactiu sexe i HFD. Post-hoc (t-test, $p < 0.05$): a, femelles vs mascles; b, HFD vs control. *In vitro*, els valors s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de tres experiments duts a terme per duplicat ($n = 6$). ANOVA ($p < 0.05$): E, efecte E2; PA, efecte PA; E*PA, efecte interactiu E2 i PA. Post-hoc (t-test, $p < 0,05$): a, E2 vs vehicle; b, PA vs BSA.

Activitat i nivells proteics de PEPCCK a fetge de rata i a cèl·lules HepG2

A tots els grup d'animals l'estimulació amb insulina va reduir l'activitat de PEPCCK (fig. 37A). L'activitat d'aquest enzim va ser més baixa a les rates femella, tant en situació basal com estimulada amb insulina. La diferència d'activitat PEPCCK entre la situació no estimulada i l'estimulada amb insulina (barres ratllades a la fig. 37A), va ser menor a les rates mascle HFD que als seus controls (34% vs 13% de reducció pels mascles

control i HFD, respectivament). Per contra, a les rates femella la diferència d'activitat PEPCK entre la situació no estimulada i l'estimulada no es va alterar (27% vs 28% de reducció per les femelles control i HFD, respectivament).

A les cèl·lules HepG2, els nivells proteics de PEPCK van augmentar per efecte de l'exposició al PA (fig. 37B), situació que va ser revertida pel tractament amb E2.

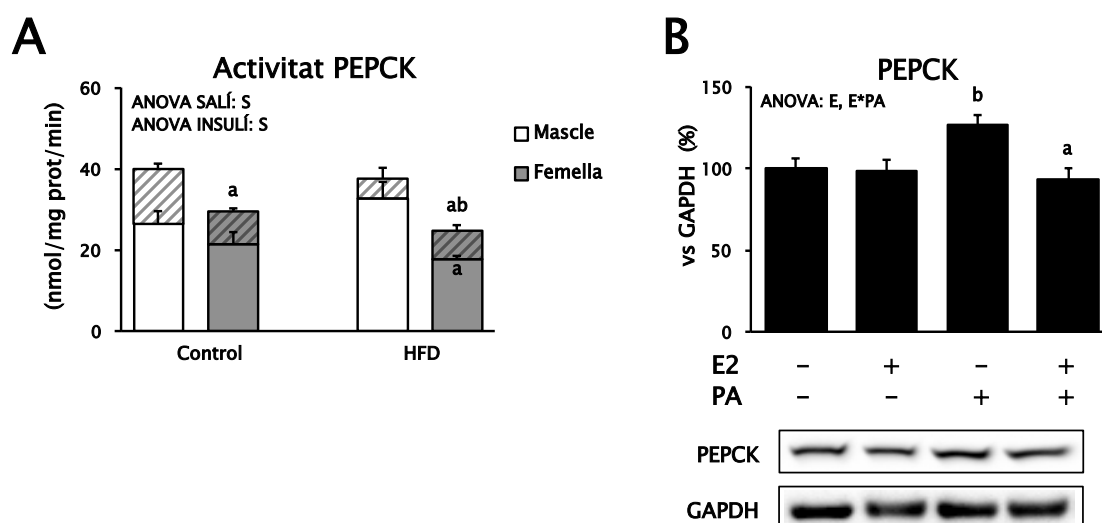


Figura 37. Activitat PEPCK al fetge de rates mascle i femella alimentades amb HFD (A) i nivells proteics de PEPCK a cèl·lules HepG2 tractades amb PA i E2 (B). A, la suma de les barres sòlides i ratllades representa l'activitat PEPCK dels animals no estimulats amb insulina; les barres sòlides representen la de les rates estimulades amb insulina (5 U/kg) 20 min abans del sacrifici. B, les cèl·lules van ser tractades amb PA (0,75 mM), combinat amb E2 (100 nM) o vehicle (etanol) durant 24h. Les cèl·lules control van ser tractades amb el vehicle del PA (BSA). Els nivells proteics de PEPCK s'han normalitzat per la intensitat de GAPDH. HFD, dieta hiperlipídica; E2, 17 β -estradiol; PA, palmitat; PEPCK, fosfoenolpiruvat carboxicinas. *In vivo*, els valors s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de 7 animals per grup. ANOVA ($p < 0.05$): S, efecte sexe; D, efecte HFD; S*D, efecte interactiu sexe i HFD. Post-hoc (t-test, $p < 0.05$): a, femelles vs mascles; b, HFD vs control. *In vitro*, els valors s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de tres experiments duts a terme per duplicat ($n = 6$). ANOVA ($p < 0,05$): E, efecte E2; PA, efecte PA; E*PA, efecte interactiu E2 i PA. Post-hoc (t-test, $p < 0,05$): a, E2 vs vehicle; b, PA vs BSA.

Activació de JNK a fetge de rata i a cèl·lules HepG2

L'activació de JNK va ser major a les rates mascle en comparació a les femella (fig. 38A), i l'alimentació amb la HFD la va incrementar als dos sexes, però de manera més pronunciada als mascles. De manera semblant, a les cèl·lules HepG2 el tractament amb PA va incrementar l'activació de JNK (fig. 38B) i la suplementació amb E2 es va traduir en una reducció de l'activació de JNK, inclús en absència de PA.

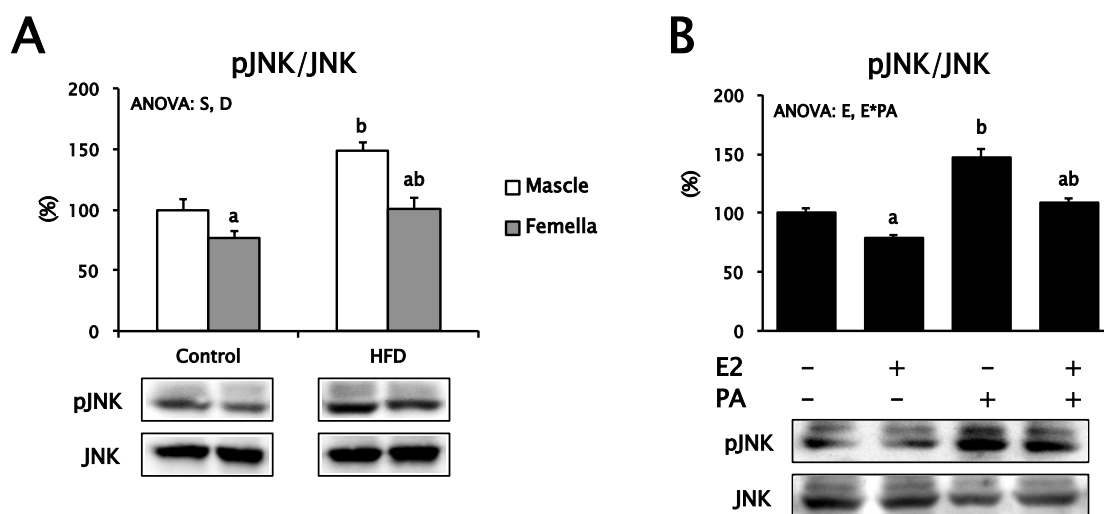


Figura 38. Activació de JNK al fetge de rates mascle i femella alimentades amb HFD (A) i a cèl·lules HepG2 tractades amb PA i E2. B, les cèl·lules van ser tractades amb PA (0,75 mM), combinat amb E2 (100 nM) o vehicle (etanol) durant 24h. Les cèl·lules control van ser tractades amb el vehicle del PA (BSA). Els nivells proteics de pJNK s'han normalitzat per la intensitat de JNK. HFD, dieta hiperlipídica; E2, 17 β -estradiol; PA, palmitat; JNK, cinasa de l'extrem N-terminal de c-Jun. *In vivo*, els valors s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de 7 animals per grup. ANOVA ($p < 0.05$): S, efecte sexe; D, efecte HFD; S*D, efecte interactiu sexe i HFD. Post-hoc (t-test, $p < 0.05$): a, femelles vs mascles; b, HFD vs control. *In vitro*, els valors s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de tres experiments duts a terme per duplicat ($n = 6$). ANOVA ($p < 0.05$): E, efecte E2; PA, efecte PA; E*PA, efecte interactiu E2 i PA. Post-hoc (t-test, $p < 0,05$): a, E2 vs vehicle; b, PA vs BSA.

Funció mitocondrial i estrès oxidatiu a fetge de rata i a cèl·lules HepG2

Les rates control femella van presentar nivells més elevats de PGC-1 α , PGC-1 β , COX IV, TFAM i UCP2 en comparació als mascles (taula 13 i fig. 39A). El tractament dietètic va provocar una sèrie de canvis diferencials entre sexes. Així, els nivells de COX IV van disminuir només a les

femelles, assolint valors semblants als dels mascles, mentre que els nivells de TFAM i UCP2 es reduïren únicament als mascles. Referent als nivells de mtDNA, aquests van disminuir un 37% als mascles i un 15% a les femelles. A més a més, la peroxidació lipídica (HNE), notablement inferior a les rates femella, va augmentar exclusivament als mascles. També es va observar un dimorfisme sexual quant a la TAC, ja que va disminuir als mascles i va augmentar a les femelles.

Taula 13. Efecte de la HFD sobre marcadors de funció mitocondrial i estrès oxidatiu al fetge de rates mascle i femella.

		Control	HFD	ANOVA
mtDNA (ua)	Mascle	1,00 ± 0,08	0,63 ± 0,04 ^b	D, S*D
	Femella	0,93 ± 0,02	0,79 ± 0,03 ^{ab}	
PGC-1α (ua)	Mascle	1,00 ± 0,13	0,86 ± 0,10	S
	Femella	1,60 ± 0,18 ^a	1,40 ± 0,14 ^a	
PGC-1β (ua)	Mascle	1,00 ± 0,07	0,98 ± 0,17	S
	Femella	1,49 ± 0,17 ^a	1,35 ± 0,06 ^a	
COX IV (%)	Mascle	100 ± 3	101 ± 5	S, D, S*D
	Femella	127 ± 3 ^a	98 ± 3 ^b	
TFAM (%)	Mascle	100 ± 5	86 ± 2 ^b	S
	Femella	138 ± 16 ^a	133 ± 7 ^a	
HNE (%)	Mascle	100 ± 3	116 ± 7 ^b	S, S*D
	Femella	82,5 ± 3,3 ^a	68,6 ± 8,6 ^a	
UCP2 (%)	Mascle	100 ± 9	72,1 ± 8,4 ^b	S
	Femella	129 ± 7 ^a	120 ± 17 ^a	
TAC (μmols trolox/g teixit)	Mascle	269 ± 12	229 ± 7 ^b	S*D
	Femella	253 ± 4	281 ± 10 ^{ab}	

Els nivells de mRNA s'expressen en unitats arbitràries (ua); els nivells proteics s'han normalitzat per la intensitat de GAPDH. HFD, dieta hiperlipídica; mtDNA, DNA mitocondrial; PGC-1 α , coactivador 1 α del receptor activat per proliferadors peroxisomals γ ; PGC-1 β , coactivador 1 β del receptor activat per proliferadors peroxisomals γ ; COX IV, subunitat IV de la citocrom c oxidasa; TFAM, factor de transcripció mitocondrial A; HNE, 4-hidroxinonenal; UCP2, proteïna desacoblant 2; TAC, capacitat antioxidant total. Els valors s'expressen com a mitjana ± error estàndard de 7 animals per grup. ANOVA (p<0.05): S, efecte sexe; D, efecte HFD; S*D, efecte interactiu sexe i HFD. Post-hoc (t-test, p<0.05): a, femelles vs mascles; b, HFD vs control.

Les cèl·lules HepG2 tractades amb E2 van mostrar nivells més elevats de PGC-1 β , TFAM i Mn-SOD (taula 14 i fig. 39B). Per la seva banda, l'exposició al PA va provocar a les cèl·lules un augment dels nivells de mRNA de PGC-1 α , PGC-1 β i UCP2, increment que es va potenciar encara més amb l'addició d'E2 en el cas de PGC-1 β i UCP2. Els nivells proteics de catalasa, que van disminuir amb el tractament amb PA, es van restaurar amb la combinació amb E2.

Taula 14. Efecte del PA i l'E2 sobre marcadors de funció mitocondrial i defenses antioxidants a cèl·lules HepG2.

		Control	PA	ANOVA
PGC-1 α (ua)	-E2	1,00 \pm 0,05	1,22 \pm 0,06 ^b	PA
	+E2	1,06 \pm 0,04	1,30 \pm 0,07 ^b	
PGC-1 β (ua)	-E2	1,00 \pm 0,07	1,41 \pm 0,02 ^b	E, PA, E*PA
	+E2	1,20 \pm 0,02 ^a	1,75 \pm 0,11 ^{ab}	
TFAM (%)	-E2	100 \pm 4	98,8 \pm 8,7	E
	+E2	125 \pm 11 ^a	127 \pm 9 ^a	
Mn-SOD (%)	-E2	100 \pm 4	95,3 \pm 5,0	E
	+E2	131 \pm 13 ^a	118 \pm 7 ^a	
Catalasa (%)	-E2	100 \pm 6	69,0 \pm 2,2 ^b	E, PA, E*PA
	+E2	96,5 \pm 5,0	98,4 \pm 6,1 ^a	
UCP2 (ua)	-E2	1,00 \pm 0,04	1,27 \pm 0,07 ^b	E, PA, E*PA
	+E2	1,08 \pm 0,03	1,62 \pm 0,09 ^{ab}	

Les cèl·lules van ser tractades amb PA (0,75 mM), combinat amb E2 (100 nM) o vehicle (etanol) durant 24h. Les cèl·lules control van ser tractades amb el vehicle del PA (BSA). Els nivells de mRNA s'expressen en unitats arbitràries (ua); els nivells proteics s'han normalitzat per la intensitat de GAPDH. E2, 17 β -estradiol; PA, palmitat; PGC-1 α , coactivador 1 α del receptor activat per proliferadors peroxisomals γ ; PGC-1 β , coactivador 1 β del receptor activat per proliferadors peroxisomals γ ; TFAM, factor de transcripció mitocondrial A; Mn-SOD, superòxid dismutasa de manganès; UCP2, proteïna desacoblant 2. Els valors s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de tres experiments duts a terme per duplicat (n=6). ANOVA (p<0,05): E, efecte E2; PA, efecte PA; E*PA, efecte interactiu E2 i PA. Post-hoc (t-test, p<0,05): a, E2 vs vehicle; b, PA vs BSA.

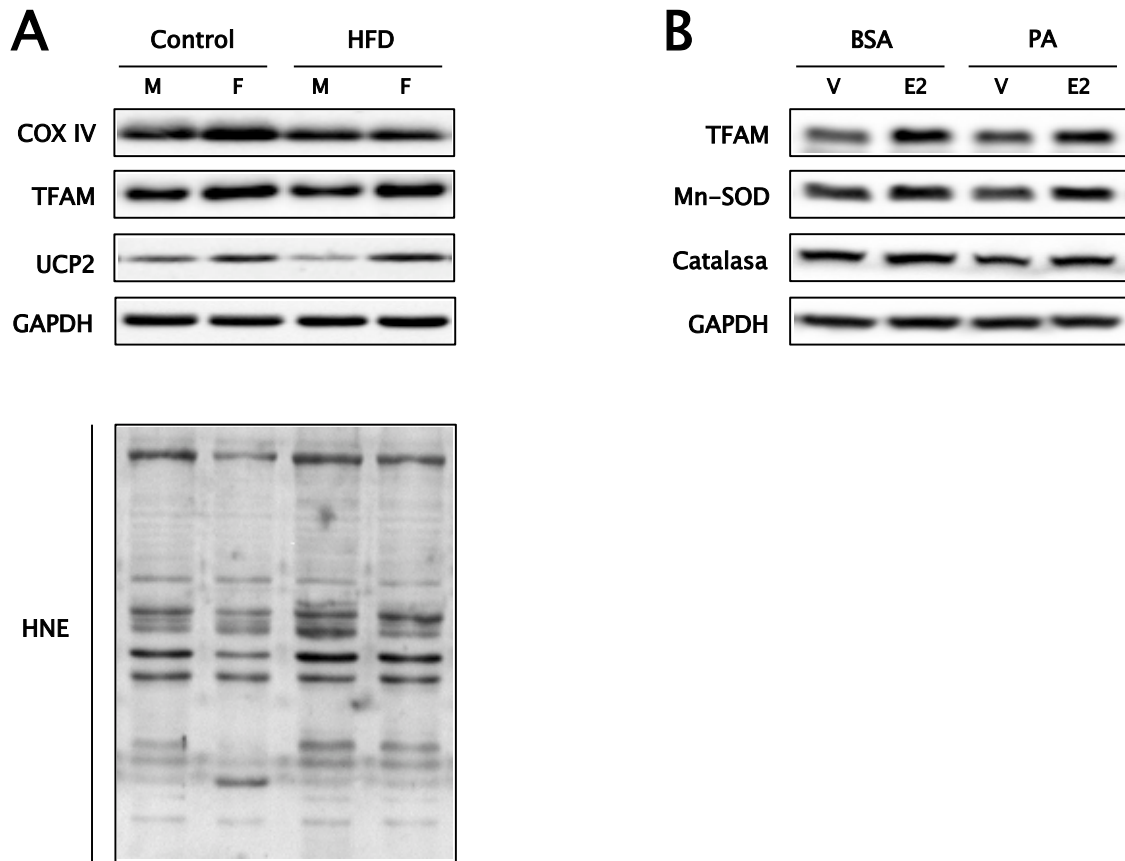


Figura 39. Immunoblots representatius de marcadors de funció mitocondrial i d'estrès oxidatiu a fetge de rates mascle i femella alimentades amb HFD (A) i a cèl·lules HepG2 tractades amb PA i E2 (B). HFD, dieta hiperlipídica; M, mascle; F, femella; E2, 17 β -estradiol; PA, palmitat; V, vehicle; COX IV, subunitat IV de la citocrom c oxidasa; TFAM, factor de transcripció mitocondrial A; UCP2, proteïna desacoblant 2; HNE, 4-hidroxinonenal; Mn-SOD, superòxid dismutasa de manganès.

En resposta al tractament hormonal, els nivells de mtDNA, el MMP i el contingut d'ATP van augmentar a les cèl·lules HepG2 (figs. 40A, 40B i 40C). Aquests paràmetres disminuïren com a conseqüència de l'exposició al PA, i van ser parcialment restaurats en presència d'E2. El contingut de ROS va augmentar en resposta al tractament amb PA (fig. 40D), però l'E2 va restablir-ne els valors.

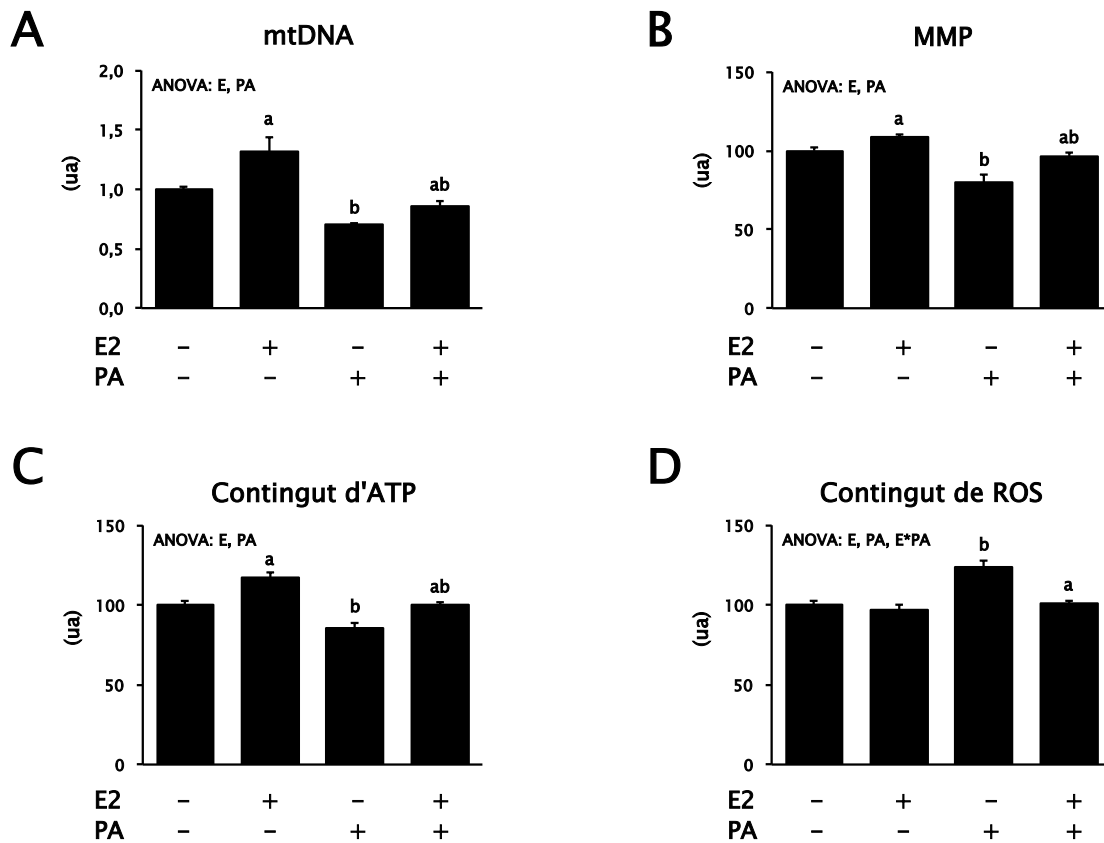


Figura 40. Efecte del PA i l'E2 sobre el mtDNA (A), el MMP (B), el contingut d'ATP (C) i el contingut de ROS (D) a cèl·lules HepG2. Les cèl·lules van ser tractades amb PA (0,75 mM), combinat amb E2 (100 nM) o vehicle (etanol) durant 24h. Les cèl·lules control van ser tractades amb el vehicle del PA (BSA). E2, 17 β -estradiol; PA, palmitat; mtDNA, DNA mitocondrial; MMP, potencial de membrana mitocondrial; ROS, espècies reactives d'oxigen. Els valors s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de tres experiments duts a terme per duplicat (n=6). ANOVA ($p < 0,05$): E, efecte E2; PA, efecte PA; E*PA, efecte interactiu E2 i PA. Post-hoc (t-test, $p < 0,05$): a, E2 vs vehicle; b, PA vs BSA.

4.2.3.2. Discussió

Al present estudi hem demostrat l'existència d'un marcat dimorfisme sexual en la pèrdua de la sensibilitat a la insulina sistèmica i hepàtica en resposta a l'alimentació amb una HFD, ja que les rates mascles mostren un major deteriorament en comparació a les femella. Les hormones sexuals, i en concret l'E2, contribueixen de manera important a aquestes diferències entre sexes, tal i com han posat de manifest els estudis *in vitro*, en els quals hem observat una millora de la sensibilitat a la insulina quan les cèl·lules HepG2 tractades amb PA s'exposen simultàniament a E2. Aquest efecte de l'hormona als hepatòcits estaria relacionat amb la disminució de l'activació de factors inflamatoris com la JNK, fet induït per la millora de la funció mitocondrial i la reducció de la producció de ROS.

La ingesta de la HFD va alterar la sensibilitat sistèmica a la insulina, sobretot en el cas de les rates mascle. Concretament, la insulinèmia, l'HOMA-IR i el rati leptina/adiponectina van augmentar únicament en aquest sexe. A més a més, sota l'estímul de la HFD, les rates mascle també mostraren una reducció de la tolerància a la glucosa. La disminució dels nivells sèrics d'adiponectina, una adipocina que incrementa la sensibilitat a la insulina, s'associa a l'estat obès i a la resistència a la insulina, tant a humans com a rosegadors (Kadowaki *et al.* 2006). Per això, no es pot descartar que l'augment dels nivells sèrics d'adiponectina a les rates femella en resposta a l'alimentació amb la HFD pugui ser una estratègia per minimitzar la pèrdua de sensibilitat a la insulina que provoca el consum de dietes hiperlipídiques. De fet, resultats previs obtinguts pel nostre grup de recerca demostren un augment de la síntesi i secreció d'adiponectina en adipòcits 3T3-L1 en resposta a l'E2 (Capllonch-Amer *et al.* 2014b), la qual cosa està d'acord amb els majors nivells d'adiponectina circulants que presenten les dones i les rates femella en comparació als mascles (Kadowaki *et al.* 2006).

Cal recordar (veure taules 10 i 11, apartat 4.2.1.; figura 28, apartat 4.2.2.) que les rates mascle alimentades amb la HFD presentaven un perfil circulant de lípids i un metabolisme lipídic hepàtic alterats, fets que s'associaven a una major acumulació intrahepàtica de greix. En aquestes condicions, l'acumulació al fetge d'intermediaris lipídics com les ceramides o els DAGs inhibirien la cascada de senyalització a la insulina (Fabbrini *et al.* 2010; Birkenfeld & Shulman 2014). Aquesta alteració de la via de la insulina es va manifestar només a les rates mascle a través de la disminució de l'activació d'Akt i, consegüentment, de la pèrdua de l'habilitat de la insulina per suprimir la gluconeogènesi (PEPCK). A més, la major resistència sistèmica a la insulina observada als mascles també contribuiria a què la senyalització de la insulina al fetge no fos capaç de inhibir la producció hepàtica de glucosa (Gruben *et al.* 2014). APPL1 és un element comú en la regulació tant de la senyalització de la insulina com de l'adiponectina al fetge (Ruan & Dong 2016). Concretament, incrementa la sensibilitat a la insulina a través de la interacció amb Akt i de la unió de IRS1/2 al receptor d'insulina (Cheng *et al.* 2009; Ryu *et al.* 2014), i a més promou els efectes de l'adiponectina al fetge mitjançant la interacció amb els receptors d'aquesta adipocina (Ruan & Dong 2016). Així, la menor sensibilitat a la insulina al fetge de les rates mascle també es podria associar a la disminució de la senyalització de l'adiponectina i dels nivells d'APPL1. Per la seva banda, les rates femella es trobaven protegides enfront de la resistència hepàtica a la insulina a través del manteniment de l'activació d'Akt, dels nivells d'APPL1 i de l'activitat PEPCK al fetge. Així doncs, la major sensibilitat sistèmica i hepàtica a la insulina que presenten les rates femella HFD podria ser atribuïda, almenys en part, al paper protector dels estrògens. En aquesta línia, estudis previs han demostrat a rates OVX una disminució de la via de senyalització de PI3K/Akt, la qual és revertida per la suplementació amb estrògens (Wang *et al.* 2013). A més a més, la importància de la senyalització estrogènica sobre la sensibilitat hepàtica a la insulina s'ha demostrat a ratolins mascle *knockout* per ER α alimentats amb una HFD (Zhu *et al.* 2014).

La contribució de l'E2 a la millora de la sensibilitat hepàtica a la insulina en condicions lipotòxiques s'evidencia als hepatòcits HepG2 tractats amb l'hormona. L'exposició al PA va incrementar el contingut lipídic intracel·lular i va reduir la sensibilitat a la insulina, d'acord amb estudis anteriors (Gao *et al.* 2010; Park *et al.* 2015). La disminució de l'activació d'Akt va anar acompanyada d'un increment dels nivells proteics de PEPCCK, indicadors d'una inducció de la gluconeogènesi. Per la seva banda, la suplementació amb E2 va atenuar l'esteatosi i va millorar la sensibilitat a la insulina, confirmant el paper protector d'aquesta hormona posat de manifest als estudis *in vivo*.

La resistència hepàtica a la insulina també s'associa amb la inflamació, a través de l'activació de vies com la de JNK (Gruben *et al.* 2014). L'activació d'aquest efector induïx la fosforilació de IRS1 al residu Ser307, fet que està implicat en la disminució de l'activació d'Akt i per tant en l'alteració de la senyalització de la insulina (Seki *et al.* 2012). L'activació de JNK s'ha observat a ratolins obesos (Hirosumi *et al.* 2002; Nakatani *et al.* 2004) i a hepatòcits tractats amb PA (Gao *et al.* 2010), ambdós models experimentals lligats al desenvolupament de resistència a la insulina. D'acord amb aquests estudis, nosaltres també vam observar una activació de JNK en resposta a l'alimentació amb HFD i a l'exposició al PA, fet que es va produir en paral·lel amb l'alteració de la sensibilitat hepàtica a la insulina anteriorment descrita. No obstant, és destacable el fet que les rates femella, tant les control com les HFD, van mostrar una menor activació de JNK en comparació a les respectives rates mascle. De manera similar, a les cèl·lules HepG2 tractades amb E2 la fosforilació de JNK va ser menor, inclús en absència de PA. Per tant, podem suggerir que l'E2 mantindria la sensibilitat hepàtica a la insulina atenuant l'activació de JNK, tant en condicions d'excés de nutrients, com també en situació control. La regulació de les MAPK per part de l'E2 s'ha descrit als hepatòcits en altres situacions, com a rates OVX (veure taula 6 i figura 23, apartat 4.1.), i a lesions cel·lulars induïdes per hipòxia (Lee *et al.* 2008) o per isquèmia-reperfusió (Vilatoba *et al.* 2005). A més,

els estrògens poden modular altres processos antiinflamatoris al fetge, com la repressió de l'expressió de la IL-1 β (Evans *et al.* 2002). Per tant, la regulació que exerceix l'E2 sobre JNK podria associar-se a la protecció davant la inflamació i la resistència a la insulina hepàtiques.

Amb l'objectiu d'aproximar-nos al mecanisme a través del qual l'E2 disminueix l'activació de JNK, vam avaluar l'estat funcional dels mitocondris. La disfunció mitocondrial s'associa amb la generació de ROS als hepatòcits (Begrache *et al.* 2006), condicions que juguen un paper clau en el desenvolupament i la progressió d'alteracions al fetge, com la resistència a la insulina (Auger *et al.* 2015). Tenint en compte que les ROS activen JNK (Seki *et al.* 2012), la millora de la sensibilitat hepàtica a la insulina per part de l'E2 podria estar associada als efectes de l'hormona sobre la funció mitocondrial i la modulació de l'activació de JNK. Aquesta idea pren força a partir dels nostres estudis previs, on hem demostrat que la suplementació amb E2 millora tant la funció i la biogènesi mitocondrials com la capacitat antioxidant al fetge de rates OVX (Galmés-Pascual *et al.* 2017). Per tant, cal pensar que aquests efectes estrogènics es manifesten també en condicions lipotòxiques, oferint d'aquesta manera protecció enfront d'alteracions hepàtiques associades a la disfunció mitocondrial, com la resistència hepàtica a la insulina. Els resultats derivats d'aquest estudi així ho confirmen i mostren una disminució dels principals marcadors de funció mitocondrial a les rates mascle alimentades amb HFD, acompanyat per un augment de l'estrès oxidatiu. De fet, les defenses antioxidants en els mascles HFD resultaren insuficients per evitar un augment de la peroxidació lipídica. A les cèl·lules HepG2, el tractament amb PA va induir disfunció mitocondrial, augmentant la producció de ROS. Malgrat la resposta dels hepatòcits augmentant l'oxidació d'àcids grassos per contrarestar l'elevada disponibilitat de substrats (veure figura 29C, apartat 4.2.2.), el desequilibri amb la cadena de transport electrònic va conduir a una menor producció d'ATP i a la major formació de ROS, d'acord amb estudis anteriors (Begrache *et al.* 2013). Per la seva banda,

l'addició d'E2 en condicions lipotòxiques, va potenciar la funció i la biogènesi mitocondrials, permetent una reducció dels nivells d'ATP i una reversió de la producció de ROS. De manera similar, el manteniment de la funció i la biogènesi mitocondrials al fetge de les rates femella, tot i l'alimentació amb HFD, es va acompanyar d'una menor peroxidació lipídica en comparació als mascles. A més de potenciar la funció i la biogènesi mitocondrials, l'E2 també va reduir l'estrès oxidatiu a través de la millora de les defenses antioxidants. Entre elles, la UCP2 podria tenir importància en la prevenció de l'esteatosi i del dany oxidatiu a través del desacoblament que indueix, potenciant el retorn dels protons a la matriu mitocondrial (Cortez-Pinto & Machado 2009), tot i que també s'han de tenir en compte les propietats antioxidants de l'E2 degudes a la seva estructura fenòlica (Ruiz-Larrea *et al.* 1997). Els resultats previs obtinguts al fetge de rates OVX i als hepatòcits tractats amb E2 (Galmés-Pascual *et al.* 2017), es completen en aquest estudi aprofundint en els efectes protectors de l'E2 sobre la funció i la biogènesi mitocondrials en una situació lipotòxica. Així, les accions de l'E2 sobre el funcionament mitocondrial podrien tenir un impacte significatiu en l'atenuació de la progressió de la NAFLD i de les alteracions associades, com la resistència hepàtica a la insulina. L'E2, a través de la modulació de la funció del mitocondri i el corresponent descens de l'activació de JNK, podria exercir un efecte protector propiciant un manteniment de la resistència hepàtica a la insulina. D'aquesta manera, els nostres resultats no només estan d'acord amb la inhibició de JNK com a millora de la sensibilitat hepàtica a la insulina i les complicacions derivades (Hirosumi *et al.* 2002; Tuncman *et al.* 2006; Singh *et al.* 2009), sinó també amb les idees que focalitzen el manteniment d'un estat mitocondrial saludable per frenar o revertir la progressió de malalties hepàtiques (Auger *et al.* 2015).

En conclusió, els nostres resultats posen de manifest el paper de l'E2 en el manteniment de la sensibilitat hepàtica a la insulina mitjançant la millora de la funció mitocondrial i la disminució de la producció de ROS

en una situació de lipotoxicitat. La conseqüent menor activació de JNK en aquestes condicions situaria l'eix funció mitocondrial - JNK com un mecanisme destacat en el efectes protectors de l'hormona enfront de la resistència hepàtica a la insulina. Aquest estudi estén els efectes que hem descrit de l'E2 en la millora de la funció mitocondrial al fetge també en condicions lipotòxiques, contribuint així a la protecció de l'hepatòcit enfront d'alteracions subjacents a la disfunció mitocondrial. Així mateix, es contribueix a una millor comprensió del dimorfisme sexual existent en la progressió de desordres hepàtics com la NAFLD, i es recolza la idea del manteniment de l'homeòstasi mitocondrial pel tractament de patologies hepàtiques.

4.3. Dimorfisme sexual en els efectes de la rosiglitazona sobre l'acumulació de lípids, la resistència a la insulina i la funció mitocondrial al fetge en resposta a una situació lipotòxica. Paper de l'adiponectina

L'objectiu del present estudi es va centrar en analitzar si l'administració de rosiglitazona (Rsg) produïa una resposta diferencial al fetge de rates mascle i femella sotmeses a un estímul lipotòxic induït per la ingesta d'una dieta hiperlipídica (HFD). Concretament, en el context de l'objectiu general de la tesi doctoral, interessava estudiar els efectes de la Rsg sobre l'acumulació lipídica, la resistència a la insulina, la via de l'adiponectina i la funció mitocondrial al fetge.

En el disseny experimental es van utilitzar rates Wistar d'ambdós sexes alimentades amb HFD durant 16 setmanes, la meitat de les quals havien ingerit HFD suplementada amb Rsg durant les dues setmanes prèvies al sacrifici.

4.3.1. Resultats

Pes corporal, índex d'adipositat i paràmetres circulants

Les rates femella alimentades amb la HFD van mostrar un menor índex d'adipositat (taula 15). A més, els nivells de TG, NEFAs, colesterol total, LDL-c, i el rati LDL-c/HDL-c van ser menors en aquest sexe, mentre que els nivells de HDL-c van ser majors. Per la seva banda, les rates femella HFD van mostrar valors inferiors d'insulina, de leptina i dels índexs HOMA-IR i leptina/adiponectina, així com nivells superiors d'adiponectina. Referent als efectes de la Rsg, es van apreciar canvis diferencials en funció del sexe. D'aquesta manera, el tractament farmacològic va provocar respostes en ambdós sexes, però més accentuades als mascles, posades de manifest a través de la disminució de TG i del rati leptina/adiponectina, així com de l'augment

d'adiponectina. A més, només a les rates mascle van disminuir l'índex d'adipositat, els NEFAs, la insulina i la leptina, i van augmentar els nivells de HDL-c, assolint valors semblants als de les femelles en el cas de l'índex d'adipositat, dels NEFAs i del HDL-c. D'altra banda, l'índex LDL-c/HDL-c i la glucèmia van disminuir en ambdós sexes, mantenint els mascles valors superiors als de les femelles.

Taula 15. Efecte del tractament amb Rsg sobre el pes corporal, l'índex d'adipositat i paràmetres circulants a rates mascle i femella alimentades amb HFD.

		HFD	HFD+Rsg	ANOVA
Pes corporal (g)	Mascle	503 ± 16	481 ± 9	S
	Femella	277 ± 16 ^a	264 ± 5 ^a	
Índex d'adipositat (%)	Mascle	12,0 ± 0,6	8,31 ± 0,62 ^b	R
	Femella	9,52 ± 0,91 ^a	8,38 ± 0,48	
TG (mg/dl)	Mascle	314 ± 12	163 ± 4 ^b	S, R, S*R
	Femella	229 ± 17 ^a	166 ± 4 ^b	
NEFAs (mM)	Mascle	0,73 ± 0,01	0,57 ± 0,01 ^b	R, S*R
	Femella	0,60 ± 0,03 ^a	0,59 ± 0,06	
Colesterol total (mM)	Mascle	2,67 ± 0,13	2,55 ± 0,05	S
	Femella	1,93 ± 0,08 ^a	2,02 ± 0,08 ^a	
LDL-c (mM)	Mascle	0,52 ± 0,06	0,45 ± 0,03	S
	Femella	0,34 ± 0,03 ^a	0,29 ± 0,04 ^a	
HDL-c (mM)	Mascle	0,44 ± 0,07	1,08 ± 0,05 ^b	R, S*R
	Femella	0,76 ± 0,05 ^a	0,89 ± 0,10	
LDL-c/HDL-c	Mascle	1,20 ± 0,26	0,42 ± 0,03 ^b	S, R
	Femella	0,55 ± 0,11 ^a	0,30 ± 0,04 ^{ab}	
Glucosa (mg/dl)	Mascle	140 ± 4	121 ± 4 ^b	S, R
	Femella	138 ± 4	103 ± 5 ^{ab}	
Insulina (µg/l)	Mascle	0,85 ± 0,10	0,61 ± 0,04 ^b	S, R, S*R
	Femella	0,50 ± 0,01 ^a	0,52 ± 0,03 ^a	
HOMA-IR	Mascle	12,6 ± 2,5	19,1 ± 2,4	S
	Femella	3,10 ± 0,25 ^a	2,72 ± 0,13 ^a	
Adiponectina (µg/ml)	Mascle	21,3 ± 1,6	54,3 ± 3,0 ^b	S, R, S*R
	Femella	36,6 ± 0,6 ^a	56,7 ± 4,3 ^b	
Leptina (ng/ml)	Mascle	23,3 ± 3,2	13,0 ± 2,1 ^b	S, R
	Femella	7,70 ± 1,04 ^a	6,29 ± 0,38 ^a	
Leptina/adiponectina (ua)	Mascle	1,07 ± 0,16	0,24 ± 0,04 ^b	S, R, S*R
	Femella	0,28 ± 0,02 ^a	0,11 ± 0,02 ^{ab}	

L'índex d'adipositat és la suma dels pesos dels dipòsits adiposos blancs gonadal, retroperitoneal i mesentèric relativa a 100 g de pes corporal. HFD, dieta hiperlipídica; Rsg, rosiglitazona; TG, triglicèrids; NEFAs, àcids grassos no esterificats; HOMA-IR, model homeostàtic d'estimació de la resistència a la insulina; LDL-c, colesterol unit a lipoproteïnes de baixa densitat; HDL-c, colesterol unit a lipoproteïnes d'alta densitat; ua, unitats arbitràries. Els nivells de glucosa en van determinar en dejú. L'HOMA-IR es va calcular com [glucèmia en dejú * insulinèmia en dejú/22,5]. Els valors s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de 7 animals per grup. ANOVA ($p < 0.05$): S, efecte sexe; R, efecte Rsg; S*R, efecte interactiu sexe i Rsg. Post-hoc (t-test, $p < 0.05$): a, femelles vs mascles; b, HFD+Rsg vs HFD.

La tolerància a la glucosa va ser major a les rates femella alimentades amb la HFD en comparació a les mascle (fig. 41), així com mostra la menor glucèmia als 120 min després de l'administració de glucosa en aquest sexe. Per la seva banda, el tractament amb Rsg va millorar la tolerància a la glucosa, especialment a les rates mascle. Concretament en aquest sexe, la Rsg va disminuir els nivells de glucosa en sang als 60 i 120 min després de la seva injecció.

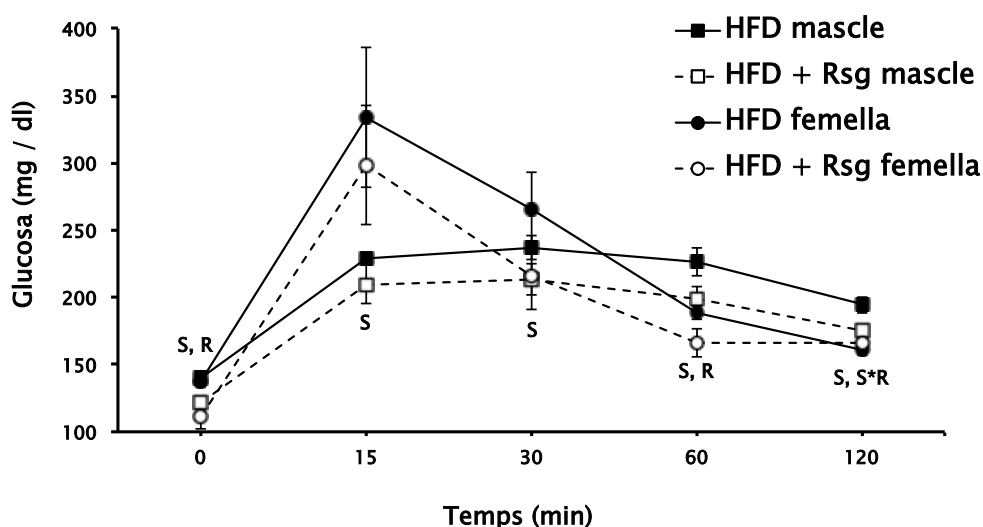


Figura 41. Efecte del tractament amb Rsg sobre la tolerància a la glucosa a rates mascle i femella alimentades amb HFD. Després de 12h en dejú, els animals van rebre una injecció via intraperitoneal de glucosa (2 g per kg de pes corporal). HFD, dieta hiperlipídica; Rsg, rosiglitazona. Els valors s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de 7 animals per grup. ANOVA ($p < 0.05$): S, efecte sexe; R, efecte Rsg; S*R, efecte interactiu sexe i Rsg.

Pes del fetge i composició lipídica hepàtica

El pes del fetge i el pes específic del teixit van ser menors a les rates femella HFD (taula 16), mentre que el tractament amb Rsg va suposar la disminució del pes del teixit, especialment als mascles. El contingut lipídic, el de TG, de NEFAs i de colesterol van ser inferiors a les rates femella HFD, i van disminuir amb el tractament amb Rsg, encara que de manera més accentuada als mascles en el cas de la trigliceridèmia i del colesterol, i exclusivament en aquest sexe en el cas del contingut lipídic total i dels NEFAs.

Taula 16. Efecte del tractament amb Rsg sobre el pes del fetge i la composició lipídica hepàtica a rates mascle i femella alimentades amb HFD.

		HFD	HFD+Rsg	ANOVA
Pes fetge (g)	Mascle	14,0 ± 0,2	12,4 ± 0,1 ^b	S, R, S*R
	Femella	6,98 ± 0,20 ^a	6,34 ± 0,10 ^{ab}	
Pes específic fetge (g/100 g PC)	Mascle	2,83 ± 0,05	2,69 ± 0,06 ^b	S
	Femella	2,54 ± 0,07 ^a	2,47 ± 0,06 ^a	
Contingut lipídic (mg/g teixit)	Mascle	52,8 ± 5,8	38,3 ± 3,2 ^b	S, R
	Femella	31,5 ± 2,9 ^a	27,9 ± 2,2 ^a	
TG (mg/g teixit)	Mascle	49,8 ± 3,2	19,8 ± 1,2 ^b	S, R, S*R
	Femella	25,3 ± 0,6 ^a	19,5 ± 1,9 ^b	
NEFAs (µmols/g teixit)	Mascle	0,77 ± 0,06	0,61 ± 0,03 ^b	S, R
	Femella	0,57 ± 0,04 ^a	0,48 ± 0,05 ^a	
Colesterol total (mg/g teixit)	Mascle	13,9 ± 1,3	7,49 ± 1,19 ^b	S, R, S*R
	Femella	7,38 ± 0,15 ^a	6,42 ± 0,23 ^b	

HFD, dieta hiperlipídica; Rsg, rosiglitazona; PC, pes corporal; TG, triglicèrids; NEFAs, àcids grassos no esterificats. Els valors s'expressen com a mitjana ± error estàndard de 7 animals per grup. ANOVA (p<0.05): S, efecte sexe; R, efecte Rsg; S*R, efecte interactiu sexe i Rsg. Post-hoc (t-test, p<0.05): a, femelles vs mascles; b, HFD+Rsg vs HFD.

Nivells de mRNA de PPAR γ i d'adiponectina a fetge i a teixit adipós de rata

Les rates femella HFD i HFD+Rsg presentaren al fetge nivells de mRNA de PPAR γ inferiors als dels mascles (fig. 42A). El tractament amb Rsg no va produir canvis. En ambdós dipòsits de WAT, els nivells de mRNA de PPAR γ i d'adiponectina van mostrar un perfil semblant (figs. 42B i 42C). En el WAT gonadal, les rates mascle i femella HFD mostraren nivells de mRNA de PPAR γ i adiponectina semblants i el tractament amb Rsg va suposar un increment significatiu d'aquests paràmetres en ambdós sexes. No obstant, en el cas de l'adiponectina, l'increment dels nivells de mRNA per efecte de la Rsg va ser superior a les femelles. En el WAT retroperitoneal, els nivells de mRNA de PPAR γ van ser més elevats a les femelles HFD, mentre que els de l'adiponectina van ser semblants en ambdós sexes. La Rsg va exercir un efecte diferencial segons el sexe, provocant un increment dels nivells de mRNA d'ambdues proteïnes només en els mascles.

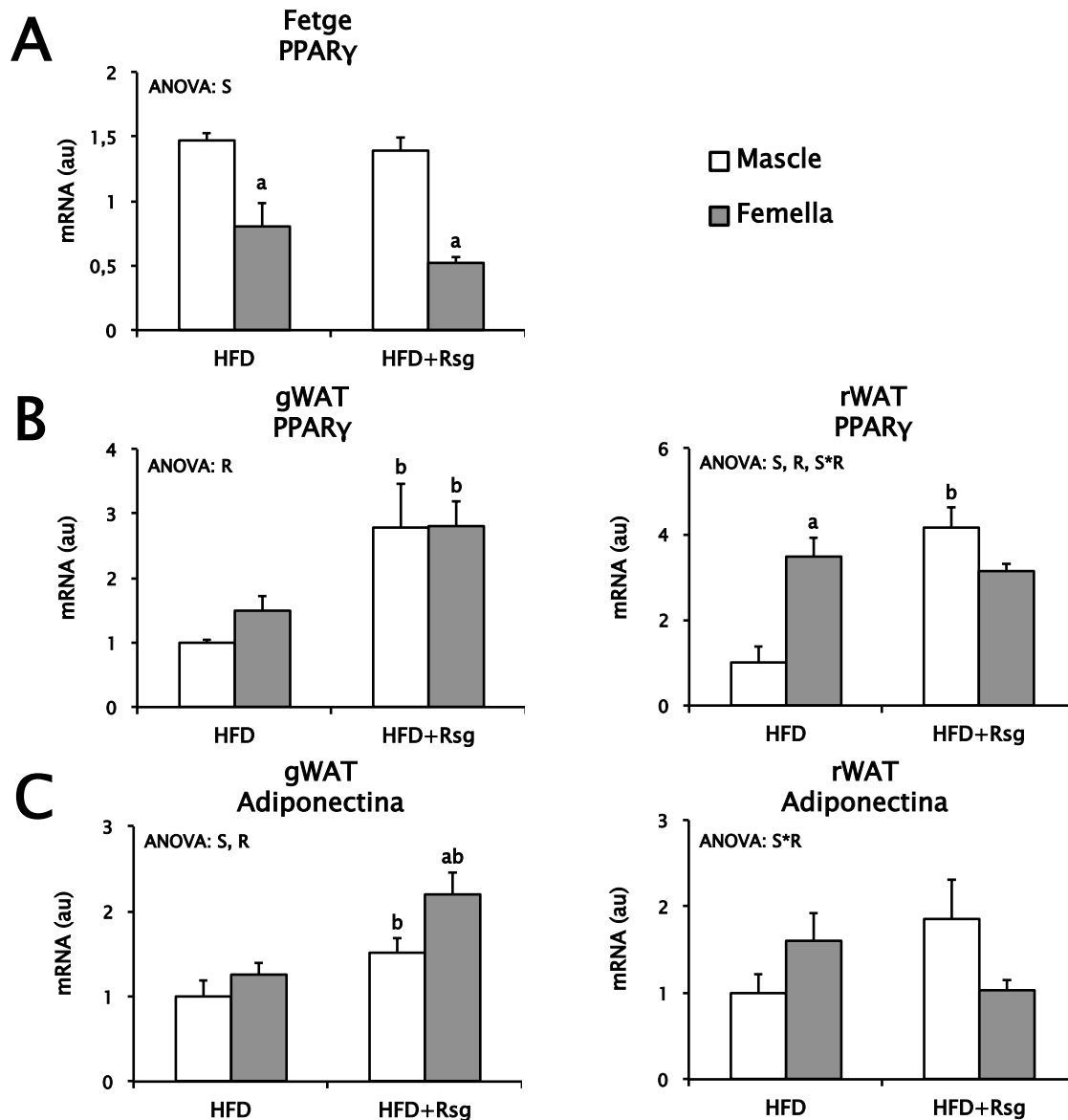


Figura 42. Efecte del tractament amb Rsg sobre els nivells de mRNA de PPAR γ al fetge (A) i al teixit adipós (B), i sobre els nivells de mRNA d'adiponectina al teixit adipós (C) de rates mascle i femella alimentades amb HFD. Els nivells de mRNA s'expressen en unitats arbitràries (ua). HFD, dieta hiperlipídica; Rsg, rosiglitazona; gWAT, teixit adipós gonadal; rWAT, teixit adipós retroperitoneal; PPAR γ , receptor activat per proliferadors peroxisomals γ . Els valors s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de 7 animals per grup. ANOVA ($p < 0.05$): S, efecte sexe; R, efecte Rsg; S*R, efecte interactiu sexe i Rsg. Post-hoc (t-test, $p < 0.05$): a, femelles vs mascles; b, HFD+Rsg vs HFD.

Marcadors de funció mitocondrial i d'estrès oxidatiu, i activació de JNK a fetge de rata

Les rates femella HFD van presentar nivells més elevats de mtDNA, PGC-1 α , PGC-1 β , TFAM i TAC (taula 17 i figura 43), així com una menor

peroxidació lipídica (HNE) i activació de JNK. El tractament amb Rsg va incrementar els nivells de mtDNA i PGC-1 β en ambdós sexes, tot i que fins a valors superiors a les femelles en el cas del mtDNA. A més, el tractament farmacològic va causar efectes diferencials en funció del sexe en varis dels paràmetres estudiats. D'una banda, va incrementar els nivells de PGC-1 α , TFAM, PRXIII i PON1 només a les rates mascle, assolint valors semblants als de les femelles en el cas de PGC-1 α i TFAM. En canvi, la peroxidació lipídica i l'activació de JNK van disminuir exclusivament als mascles, equiparant-se als valors de les femelles. D'altra banda, la TAC va presentar una resposta oposada: va augmentar en el cas de les femelles i va disminuir als mascles.

Taula 17. Efecte del tractament amb Rsg sobre marcadors de funció mitocondrial i d'estrès oxidatiu, i activació de JNK al fetge de rates mascle i femella alimentades amb HFD.

		HFD	HFD+Rsg	ANOVA
mtDNA (ua)	Mascle	0,63 \pm 0,04	0,75 \pm 0,04 ^b	S, R
	Femella	0,79 \pm 0,03 ^a	0,90 \pm 0,06 ^{ab}	
PGC-1 α (ua)	Mascle	0,86 \pm 0,10	1,57 \pm 0,26 ^b	NS
	Femella	1,40 \pm 0,14 ^a	1,46 \pm 0,14	
PGC-1 β (ua)	Mascle	0,98 \pm 0,17	1,94 \pm 0,33 ^b	R
	Femella	1,35 \pm 0,06 ^a	2,03 \pm 0,18 ^b	
COX IV (%)	Mascle	101 \pm 5	102 \pm 4	NS
	Femella	97,8 \pm 3,3	113 \pm 6	
TFAM (%)	Mascle	86,2 \pm 2,3	130 \pm 12 ^b	S*R
	Femella	133 \pm 7 ^a	119 \pm 10	
HNE (%)	Mascle	116 \pm 7	84,4 \pm 4,1 ^b	S, S*R
	Femella	68,6 \pm 8,6 ^a	74,6 \pm 8,8	
PRXIII (%)	Mascle	95,0 \pm 4,5	138 \pm 14 ^b	R
	Femella	95,1 \pm 8,0	102 \pm 9 ^a	
TAC (μ mols trolox/g teixit)	Mascle	229 \pm 7	254 \pm 5 ^b	S, S*R
	Femella	281 \pm 10 ^a	240 \pm 7 ^b	
PON1 (ua)	Mascle	0,92 \pm 0,07	1,22 \pm 0,05 ^b	R, S*R
	Femella	0,95 \pm 0,06	0,94 \pm 0,03 ^a	
pJNK/JNK (ua)	Mascle	149 \pm 7	107 \pm 10 ^b	S, S*R
	Femella	100 \pm 10 ^a	115 \pm 8	

Els nivells de mRNA s'expressen en unitats arbitràries (ua); els nivells proteics s'han normalitzat per la intensitat de GAPDH, llevat dels de pJNK, que s'han

normalitzat per JNK. HFD, dieta hiperlipídica; Rsg, rosiglitazona; mtDNA, DNA mitocondrial; PGC-1 α , coactivador 1 α del receptor activat per proliferadors peroxisomals γ ; PGC-1 β , coactivador 1 β del receptor activat per proliferadors peroxisomals γ ; COX IV, subunitat IV de la citocrom c oxidasa; TFAM, factor de transcripció mitocondrial A; HNE, 4-hidroxinonenal; PRXIII, peroxiredoxina III; TAC, capacitat antioxidant total; PON1, paraoxonasa 1; JNK, cinasa de l'extrem N-terminal de c-Jun. Els valors s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de 7 animals per grup. ANOVA ($p < 0.05$): S, efecte sexe; R, efecte Rsg; S*R, efecte interactiu sexe i Rsg, NS, cap efecte significatiu. Post-hoc (t-test, $p < 0.05$): a, femelles vs mascles; b, HFD+Rsg vs HFD.

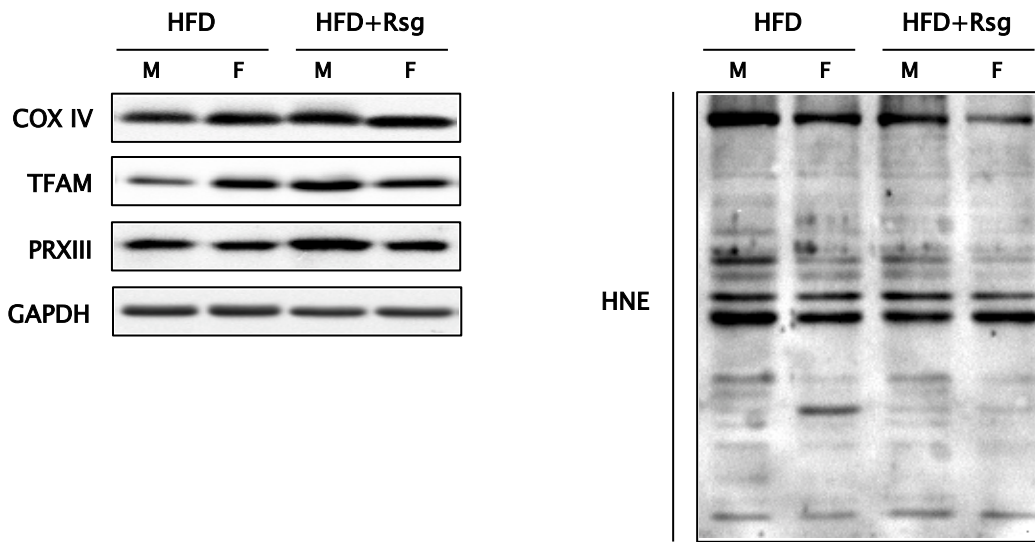


Figura 43. Immunoblots representatius de marcadors de funció mitocondrial i d'estrès oxidatiu, i activació de JNK al fetge de rates mascle i femella alimentades amb HFD i Rsg. HFD, dieta hiperlipídica; Rsg, rosiglitazona; M, mascle; F, femella; COX IV, subunitat IV de la citocrom c oxidasa; TFAM, factor de transcripció mitocondrial A; PRXIII, peroxiredoxina III; HNE, 4-hidroxinonenal.

Nivells de proteïnes intermediàries de la via de senyalització de l'adiponectina a fetge de rata

Els nivells proteics d'AdipoR2 i d'APPL1 van ser majors a les rates femella HFD (fig. 44). El tractament amb Rsg va incrementar els nivells d'AdipoR2 en ambdós sexes, els d'APPL1 als mascles i l'activació d'AMPK a les femelles.

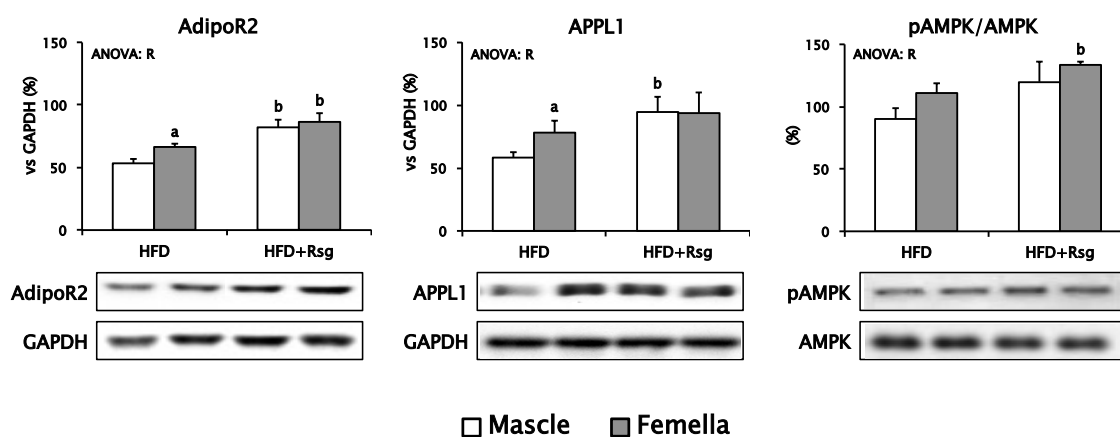


Figura 44. Efecte del tractament amb Rsg sobre els nivells de proteïnes intermediàries de la via de senyalització de l'adiponectina al fetge de rates mascle i femella alimentades amb HFD. Els nivells proteics s'han normalitzat per la intensitat de GAPDH, llevat dels de pAMPK, que s'han normalitzat per AMPK. HFD, dieta hiperlipídica; Rsg, rosiglitazona; AdipoR2, receptor 2 de l'adiponectina; APPL1, proteïna adaptadora 1 que conté una interacció de fosfotirosines, un domini PH i una cremallera de leucina; AMPK, cinasa activada per AMP. Els valors s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de 7 animals per grup. ANOVA ($p < 0.05$): S, efecte sexe; R, efecte Rsg; S*R, efecte interactiu sexe i Rsg. Post-hoc (t-test, $p < 0.05$): a, femelles vs mascles; b, HFD+Rsg vs HFD.

Activitat PEPCCK i activació d'Akt a fetge de rata

L'estimulació amb insulina va reduir l'activitat PEPCCK a tots els grups experimentals (fig. 45A). L'activitat d'aquest enzim de la gluconeogènesi va ser menor a les rates femella alimentades amb la HFD en comparació als mascles, tant en situació basal com d'estimulació amb insulina. L'administració de Rsg va suposar un descens de l'activitat PEPCCK només als mascles, assolint els valors de les femelles. A més, la diferència d'activitat PEPCCK entre la situació no estimulada i l'estimulada amb insulina (barres ratllades a la fig. 45A), va ser major a les rates mascle HFD+Rsg que a les HFD. Concretament, als mascles, l'administració d'insulina va suposar una reducció de l'activitat PEPCCK d'un 13% pel grup HFD, i d'un 41% pel grup HFD+Rsg. En canvi, a les rates femella, la diferència d'activitat PEPCCK entre la situació no estimulada i l'estimulada pràcticament no es va alterar (28% vs 32% de reducció pels grups HFD i HFD+Rsg, respectivament).

L'activació d'Akt va ser major a les rates femella HFD i va augmentar en resposta al tractament amb Rsg en ambdós sexes (fig. 45B).

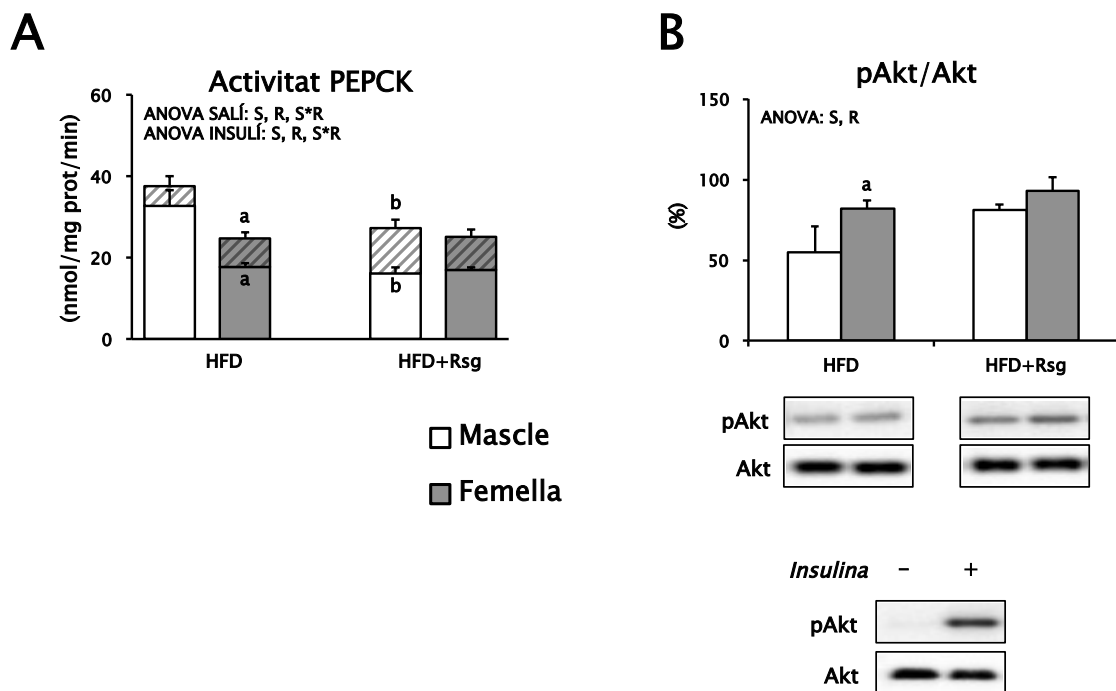


Figura 45. Efecte del tractament amb Rsg sobre l'activitat de PEPCK (A) i l'activació d'Akt (B) al fetge de rates mascle i femella alimentades amb HFD. Les rates van ser tractades amb insulina (5 U/Kg) 20 min abans del sacrifici. A, la suma de les barres sòlides i ratllades representa l'activitat PEPCK dels animals no estimulats amb insulina; les barres sòlides representen la de les rates estimulades amb insulina. B, els nivells proteics de pAkt s'han normalitzat per la intensitat d'Akt. HFD, dieta hiperlipídica; Rsg, rosiglitazona; PEPCK, fosfoenolpiruvat carboxicinasa. Els valors s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de 7 animals per grup. ANOVA ($p < 0.05$): S, efecte sexe; R, efecte Rsg; S*R, efecte interactiu sexe i Rsg. Post-hoc (t-test, $p < 0.05$): a, femelles vs mascles; b, HFD+Rsg vs HFD.

Nivells de mRNA de marcadors del metabolisme lipídic a fetge de rata

Les rates femella HFD van presentar nivells majors de mRNA de CD36, FABP1 i PPAR α (fig. 46), mentre que els nivells de SREBP-1c van ser menors en aquest sexe. El tractament amb Rsg va incrementar els nivells de mRNA de MTP i CD36 únicament a les femelles. Per la seva banda, l'expressió de SREBP-1c només es va reduir als mascles fins assolir el valor de les rates femella. A més, els nivells de mRNA de PPAR α i CTP1A van augmentar a les rates mascle i van disminuir a les femella amb el tractament farmacològic.

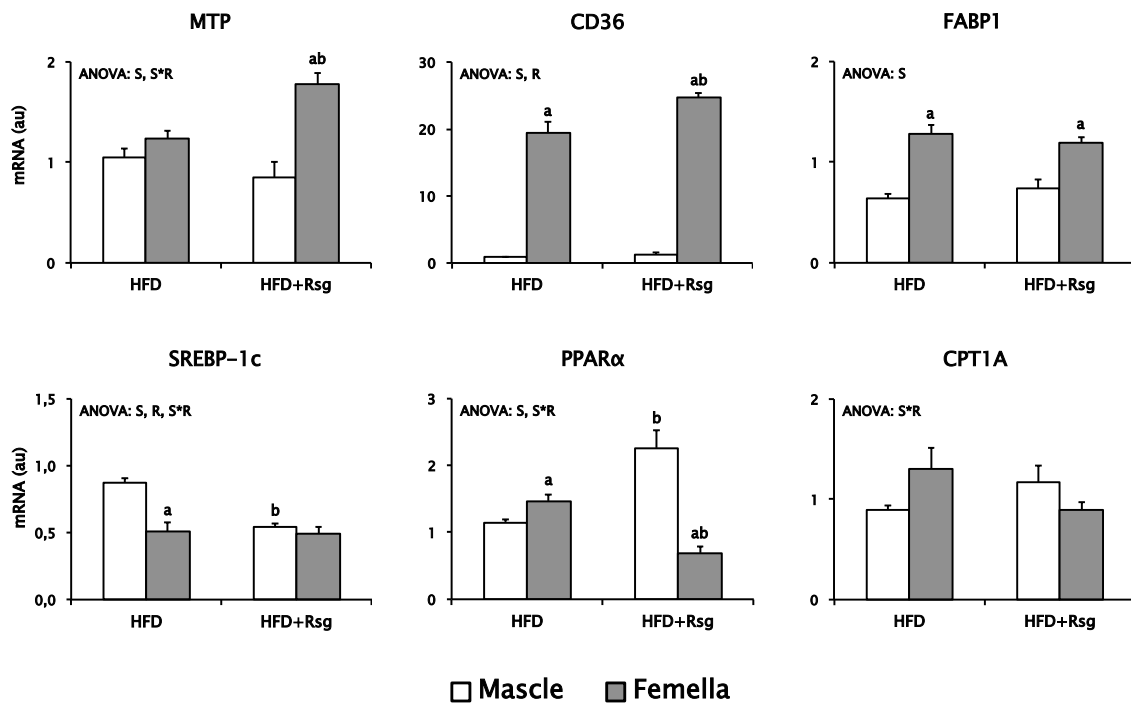


Figura 46. Efecte del tractament amb Rsg sobre els nivells de mRNA de marcadors de metabolisme lipídica al fetge de rates mascle i femella alimentades amb HFD. Els nivells de mRNA s'expressen en unitats arbitràries (ua). HFD, dieta hiperlipídica; Rsg, rosiglitazona; PPAR α , receptor activat per proliferadors peroxisomals α ; CPT1A, transferasa 1A de palmitoilcarnitina; SREBP-1c, proteïna 1c d'unió a elements reguladors d'esterols; MTP, proteïna de transferència de triacilglicerols microsomal. Els valors s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de 7 animals per grup. ANOVA ($p < 0.05$): S, efecte sexe; R, efecte Rsg; S*R, efecte interactiu sexe i Rsg. Post-hoc (t-test, $p < 0.05$): a, femelles vs mascles; b, HFD+Rsg vs HFD.

4.3.2. Discussió

La Rsg s'ha usat en models animals i en humans en la millora de la sensibilitat a la insulina, de la glucèmia i de la lipèmia; situacions associades a l'obesitat i a la resistència a la insulina (Olefsky 2000; Yki-Järvinen 2004). Per això, hem usat la Rsg com una eina inductora de la reversió del perfil lipotòxic de l'hepatòcit i hem avaluat els canvis que genera sobre la sensibilitat a la insulina, l'esteatosi i la funció mitocondrial al fetge. Com a resultat, hem posat de manifest l'existència d'un dimorfisme sexual en els efectes de la Rsg a rates alimentades amb una HFD, essent la resposta a l'administració del fàrmac més acusada a les rates mascle. Aquest fet es pot relacionar amb la major disfunció metabòlica que indueix el consum de la HFD en els mascles. En aquesta situació de lipotoxicitat, la suplementació amb Rsg ha millorat la sensibilitat sistèmica i hepàtica a la insulina i la funció mitocondrial, i ha reduït l'esteatosi i l'estrès oxidatiu al fetge, respostes que s'han manifestat especialment a les rates mascle en comparació a les femella.

Concretament, els efectes de la Rsg sobre la disminució de la lipèmia i la insulinèmia, així com sobre la millora de la tolerància a la glucosa, es van produir de manera més notòria a les rates mascle. Cal destacar que com a conseqüència del consum de la HFD, els mascles presentaven un perfil metabòlic menys favorable en comparació a les femelles, evidenciat per un perfil lipídic menys saludable i una menor sensibilitat sistèmica a la insulina (veure taula 10, apartat 4.2.1.; taula 12 i figura 34, apartat 4.2.3.), de manera que la Rsg seria més efectiva en condicions de major disfunció metabòlica. De fet, en models animals amb alimentació control, les TZDs exerceixen pocs o nuls efectes en la disminució de la glucèmia, mentre que en models animals de resistència a la insulina s'han demostrat àmpliament les accions beneficioses de les TZDs en la millora de la sensibilitat a la insulina i la reducció de la glucèmia i la lipèmia (Day 1999; Olefsky 2000). En aquesta línia, la major resistència a la insulina i la major lipèmia induïdes per la HFD a

les rates mascle, explicaria aquest dimorfisme sexual en la resposta a la Rsg. Cal destacar també l'augment observat en els nivells circulants de HDL-c als mascles per efecte del fàrmac, d'acord amb el que s'ha descrit prèviament (Chiquette *et al.* 2004), així com la disminució de l'índex LDL-c/HDL-c, indicador d'un menor risc cardiovascular (Fernandez & Webb 2008).

Les TZDs exerceixen els seus efectes a través de la unió específica i activació de PPAR γ (Tontonoz & Spiegelman 2008). Aquests factors de transcripció es troben majoritàriament als adipòcits, on la seva activació promou l'adipogènesi. Com a resultat, els adipòcits incrementen la capacitat de captar àcids grassos i d'emmagatzemar lípids, alhora que augmenten la sensibilitat a la insulina (Tontonoz & Spiegelman 2008). L'efecte de la Rsg estimulants l'expressió de PPAR γ es va manifestar en els dos teixits adiposos estudiats, el retroperitoneal i el gonadal, resultat que es pot associar amb la disminució dels nivells sèrics de NEFAs i amb la millora de la sensibilitat a la insulina observada a les rates mascle tractades amb Rsg. En comparació al teixit adipós, el fetge normalment expressa nivells baixos de PPAR γ , però la seva sobreexpressió és una característica pròpia dels fetges esteatòsics, ja que PPAR γ promou l'activació de gens lipogènics i, per tant, l'acumulació de lípids al teixit (Morán-Salvador *et al.* 2011; Videla & Pettinelli 2012). De fet, en el fetge de ratolins exposats a una HFD, la deleció específica de PPAR γ protegeix del desenvolupament de l'esteatosi (Morán-Salvador *et al.* 2011). Al nostre estudi, el tractament amb Rsg no va induir canvis en l'expressió hepàtica de PPAR γ , encara que són destacables els nivells d'expressió més elevats que presenten les rates mascle i que serien indicadors del major grau d'esteatosi que presenten aquests animals per efecte de la HFD. El fet que l'expressió de PPAR γ no es va alterar al fetge en resposta a la Rsg, però sí va augmentar al WAT, recolza la idea que les TZDs actuen de forma principal al WAT, des d'on exerceixen les seves accions beneficioses sobre altres teixits com el fetge (Huang *et al.* 2013; Vacca *et al.* 2015;

Mulder *et al.* 2016). L'administració de TZDs atenua l'acumulació de greix al fetge i millora la sensibilitat a la insulina en pacients afectats de NAFLD i en ratolins exposats a una HFD, exercint un paper protector enfront de la progressió de lesions als hepatòcits (Tiikkainen *et al.* 2004; Juurinen *et al.* 2008; Singh *et al.* 2015; Mulder *et al.* 2016). Aquests efectes sobre el fetge es produïrien secundàriament a les senyals emeses pel WAT induïdes per la unió específica de les TZDs al PPAR γ d'aquest teixit. Així, ratolins alimentats amb una HFD i amb deleció específica de PPAR γ al fetge responen favorablement a la Rsg, millorant el perfil sistèmic i reduint l'esteatosi al fetge (Gavrilova *et al.* 2003). A més, l'administració de TZDs directament sobre hepatòcits aïllats es relaciona amb un increment de l'acumulació de lípids (Schadinger *et al.* 2005), i amb l'absència de canvis en la resposta a la senyalització de la insulina (Jiang *et al.* 2002), emfatitzant la idea que les TZDs actuen indirectament al fetge per mecanismes independents del PPAR γ hepàtic.

En ambdós sexes, el tractament amb Rsg va reduir la lipèmia com a resultat dels efectes del fàrmac sobre el WAT, i es va reflectir en la reducció de l'acumulació hepàtica de lípids i en la millora de la sensibilitat hepàtica a la insulina. Aquests efectes van ser més acusats a les rates mascle. La menor acumulació lipídica duria associada una reducció d'intermediaris lipídics com les ceramides i els DAGs al fetge. Així, la sensibilitat hepàtica a la insulina milloraria, ja que aquestes molècules interfereixen en la correcta senyalització de l'hormona (Farese *et al.* 2012). La funció mitocondrial també es va veure especialment estimulada a les rates mascle per efecte de la Rsg, associada a l'augment de les defenses antioxidants i a la disminució de la peroxidació lipídica. Els efectes de la Rsg millorant la funció mitocondrial serien importants en la defensa enfront d'alteracions als hepatòcits induïdes amb la disfunció mitocondrial (Auger *et al.* 2015). En aquesta línia, l'estimulació de la funció mitocondrial i la disminució de l'estrès oxidatiu a les rates mascle suplementades amb Rsg podrien

estar implicades en la disminució de l'activació de JNK, i per tant, amb la millora de la sensibilitat hepàtica a la insulina descrita en aquest sexe.

No obstant el que s'ha indicat, el paper de les TZDs en la NAFLD presenta certa controvèrsia, atesos els efectes contradictoris descrits en distints estudis. Per exemple, en ratolins ob/ob el tractament amb Rsg no reverteix les lesions histològiques pròpies de la NAFLD, i fins i tot incrementa els nivells hepàtics de PPAR γ , l'esteatosi i l'estrès oxidatiu, a la vegada que redueix la funció de la cadena de transport electrònic (García-Ruiz *et al.* 2007). També s'ha proposat que el tractament de ratolins amb Rsg podria estar contraindicat en el tractament de l'esteatosi al fetge quan els nivells de PPAR γ del teixit són elevats (Gao *et al.* 2016).

A part d'incrementar la diferenciació dels adipòcits, les TZDs exerceixen els seus efectes beneficiosos al WAT a través de l'augment de l'expressió i secreció d'adiponectina, una hormona que augmenta la sensibilitat a la insulina (Ruan & Dong 2016). D'acord amb això, en ambdós sexes, la Rsg va incrementar l'expressió d'adiponectina al WAT i els seus nivells circulants, canvis que s'explicarien per la diferent contribució dels depòsits adiposos a la secreció d'aquesta adipocina. Així, el WAT gonadal, participaria en major mesura a l'augment dels nivells sèrics d'adiponectina que es produeix a les rates femella. No obstant, aquest teixit també contribuiria a l'increment de l'adiponectinèmia observada als mascles, tot i que en menor mesura que a les femelles, i de manera conjunta amb el WAT retroperitoneal. Aquestes dades suggereixen l'existència d'un dimorfisme sexual a nivell de WAT en la secreció d'adiponectina induït per l'administració de Rsg, tot i que s'ha de tenir en compte la potencial aportació d'altres depòsits adiposos no estudiats.

Al fetge, l'adiponectina es relaciona amb la millora de la sensibilitat a la insulina i, a més, amb la disminució de l'esteatosi, la inflamació i la fibrosi (Silva *et al.* 2014). La importància de la senyalització de

l'adiponectina en els efectes hepatoprotectors de la Rsg s'ha demostrat en ratolins alimentats amb una HFD i *knockout* per l'adiponectina, ja que aquests animals presenten esteatosi i inflamació i una pèrdua de l'estimulació de la funció mitocondrial quan són tractats amb el fàrmac (Zhou *et al.* 2010). Aquests autors també suggereixen que les investigacions amb resultats adversos de les TZDs al fetge podrien deure's a un senyalització defectuosa de l'adiponectina. Per això, no es pot descartar que la disminució de l'acumulació de lípids i la millora de la sensibilitat a la insulina i de la funció mitocondrial al fetge, evidenciats de manera més accentuada a les rates mascle al present estudi, estiguin mediat, almenys en part, per l'acció de l'adiponectina. Així, es va observar un augment de la via de senyalització de l'adiponectina al fetge, amb la conseqüent activació d'AMPK a les rates femella i de PPAR α a les mascles. Aquests efectors participen en les accions de l'adiponectina millorant la sensibilitat a la insulina i disminuint l'esteatosi hepàtiques a través de la inhibició de la gluconeogènesi i de l'augment de la utilització dels àcids grassos (Silva *et al.* 2014). A més, l'adiponectina té un impacte important en la regulació de la funció mitocondrial, de manera que ratolins *knockout* d'adiponectina mostren mitocondris amb lesions ultraestructurals i deficiències a la cadena de transport electrònic al fetge, així com esteatosi hepàtica, condicions que poden predisposar a la progressió de dany hepàtic (Zhou *et al.* 2008).

En resposta al tractament farmacològic, la gluconeogènesi no es va veure alterada a les rates femella, tal com ho indica l'activitat PEPCCK en condicions basals i d'estimulació amb insulina. En canvi, les rates mascle tractades amb Rsg milloraren la resposta a la insulina atenuant la gluconeogènesi. A més, es va posar de manifest un dimorfisme sexual quant al maneig dels lípids al fetge en resposta a la Rsg. Per una banda, els mascles serien més propensos a l'activació dels mecanismes d'oxidació d'àcids grassos (PPAR α i CPT1A) i a la disminució de la lipògenesi (SREBP-1c), respostes que conduirien a una reducció de

l'acumulació de lípids al fetge. D'altra banda, les rates femella podrien reduir l'acumulació intrahepàtica de lípids a través d'una major secreció de VLDL (MTP). MTP participa en la lipidació de l'apolipoproteïna B-100, component estructural essencial de les VLDL, i en la maduració de les pre-VLDL abans de ser secretades (Kawano & Cohen 2013). Cal destacar que la disminució dels TG sèrics podria explicar-se a través del metabolisme d'altres teixits. Així, s'ha descrit que l'adiponectina participa en la reducció dels TG plasmàtics a través de l'increment de l'activitat LPL al múscul esquelètic (Qiao *et al.* 2008), per la qual cosa el catabolisme de les VLDL podria ser més efectiu en el cas de les rates femella. Per tant, la reducció de l'esteatosi hepàtica en resposta a la Rsg també s'explicaria per l'augment de l'oxidació d'àcids grassos i la disminució de la lipogènesi a les rates mascle, i l'augment de la secreció de VLDL a les rates femella. Aquests efectes podrien donar-se a conseqüència de l'activació de la via de l'adiponectina al fetge.

En resum, els resultats del present estudi indiquen l'existència de diferències entre sexes en la resposta al tractament amb Rsg en condicions de lipotoxicitat induïda per l'alimentació amb una HFD. Concretament, les rates mascle presenten una resposta més acusada que les femelles al tractament farmacològic, representat per una millora de l'estat sistèmic i, al fetge, per una disminució de l'esteatosi i de l'estrès oxidatiu, i una millora de la sensibilitat a la insulina i de la funció mitocondrial. Aquest comportament podria ser conseqüència del diferent grau de lipotoxicitat present a ambdós sexes, ja que el mateix tractament dietètic provoca una alteració metabòlica major a les rates mascle (veure taules 10 i 11, apartat 4.2.1.; figura 28 i 30, apartat 4.2.2.; taules 12 i 13 i figures 34-39, apartat 4.2.2.). Per investigar si els efectes observats en el present estudi podrien implicar la diferent acció de l'adiponectina entre les rates mascle i femella, es podrien dur a terme estudis en hepatòcits HepG2 en un entorn lipotòxic. L'administració d'adiponectina i d'hormones sexuals permetria conèixer si les accions de l'adiponectina serien dependents del sexe i si

explicarien el dimorfisme sexual observat entre les rates mascle i femella en resposta a la Rsg. A més, i donada la rellevància d'aquesta adipocina i de la regulació estrogènica de la funció mitocondrial, seria interessant avaluar els efectes directes que presenta l'adiponectina sobre la funció mitocondrial, i si aquests són sinèrgics als efectes de l'E2. Aquests estudis esdevindrien rellevants, ja que els nombrosos efectes hepatoprotectors de l'adiponectina la fan una molècula molt interessant per a la lluita contra la NAFLD i les alteracions associades.

5. RECAPITULACIÓ

Estudis previs duts a terme pel nostre grup d'investigació han fet palesa l'existència d'un dimorfisme sexual en la funció i la biogènesi mitocondrials a varis teixits de rata. Entre ells, el fetge de les rates femella es caracteritza per presentar mitocondris més grans i diferenciats, amb una major capacitat funcional i antioxidant (Justo *et al.* 2005a; Valle *et al.* 2007; Nadal-Casellas *et al.* 2010). Tenint en compte aquests antecedents, l'objectiu central de la present tesi ha consistit en aclarir el paper de les hormones sexuals, i en concret de l'E2, en la modulació de la funció i la biogènesi mitocondrials al fetge per aprofundir en les causes del dimorfisme sexual. A més a més, també ens ha interessat analitzar el paper d'aquesta hormona en el desenvolupament de l'esteatosi i la resistència a la insulina hepàtiques en un context de lipotoxicitat. La importància d'aquest estudi es basa en la funció rellevant del fetge com a òrgan central en la regulació del metabolisme general de l'organisme, de manera que les alteracions en el seu funcionament poden tenir un impacte significatiu sobre el manteniment de l'homeòstasi energètica global i conduir al desenvolupament de patologies hepàtiques. Per assolir aquest objectiu, s'han combinat experiments *in vivo* amb rates Wistar (d'ambdós sexes i femelles ovariectomitzades) i *in vitro* amb hepatòcits HepG2.

La privació d'estrògens associada a l'ovariectomia indueix una disminució de la funció i la biogènesi mitocondrials, així com també un increment de l'estrès oxidatiu i defectes en el metabolisme lipídic, alteracions que són revertides, algunes parcialment, quan els animals ovariectomitzats són tractats amb E2. Els estudis realitzats amb les cèl·lules HepG2 recolzen els resultats obtinguts *in vivo*, ja que el tractament amb E2 incrementa els marcadors de funció i biogènesi mitocondrials. Els nostres resultats posen de manifest el paper protector de l'E2 sobre la funció i la biogènesi mitocondrials, que es tradueix en una millora de la capacitat antioxidant i en una disminució de l'estrès oxidatiu. Per tant, queda demostrat que els estrògens, i en concret l'E2, contribueixen al dimorfisme sexual que prèviament havíem descrit en la

funció i la biogènesi mitocondrials al fetge (Justo *et al.* 2005a; Valle *et al.* 2007; Nadal-Casellas *et al.* 2010). Atès que la disfunció mitocondrial constitueix un punt clau en la progressió d'alteracions hepàtiques com la malaltia del fetge gras no alcohòlic (NAFLD) (Begrache *et al.* 2006; Cameron *et al.* 2016), la menor incidència que presenten les dones i les rates femella a patir aquesta patologia, podria relacionar-se, almenys en part, amb la protecció de la funció mitocondrial que ofereixen els estrògens.

Hem constatat que els efectes estimuladors de l'E2 sobre la funció i la biogènesi mitocondrials al fetge són mediat principalment pel coactivador transcripcional PGC-1 β . Així, el silenciament de l'expressió gènica de PGC-1 β a les cèl·lules HepG2 produeix una disminució de la funció mitocondrial, situació que el tractament amb E2 no aconsegueix revertir. En canvi, quan se silencia l'expressió gènica de PGC-1 α , no s'observen alteracions als marcadors de funció mitocondrial. Per tant, PGC-1 β és un element clau en la modulació dels efectes de l'E2 sobre el funcionament mitocondrial al fetge, i seria més susceptible que PGC-1 α a les variacions de l'entorn hormonal. De fet, la implicació de PGC-1 β com a mediador dels efectes de l'E2 sobre la biogènesi i la funció mitocondrials ja s'havia suggerit a vasos sanguinis cerebrals de rata (Kemper *et al.* 2014). A nivell hepàtic, encara que el PGC-1 β s'ha relacionat amb l'estimulació de la lipogènesi i de la síntesi i secreció de VLDL (Lin *et al.* 2005; Wolfrum & Stoffel 2006), la regulació que aquest factor de transcripció exerceix sobre els mitocondris promovent el metabolisme oxidatiu, li confereix un efecte hepatoprotector enfront de l'esteatosi (Bellafante *et al.* 2013). Per tant, el paper de PGC-1 β com a intermediari dels efectes de l'E2 sobre la funció i la biogènesi mitocondrials podria estar també associat amb la menor incidència de malalties hepàtiques al sexe femení (Tsuneto *et al.* 2010; Stöppeler *et al.* 2013; Pan & Fallon 2014). D'aquesta manera, el PGC-1 β podria constituir una diana terapèutica enfront dels desordres mitocondrials al fetge.

El desenvolupament d'esteatosi hepàtica i la seva progressió cap a situacions més lesives i difícilment reversibles estan associats amb l'obesitat, la resistència a la insulina i, en general, amb la síndrome metabòlica (Buzzetti *et al.* 2016). Els hàbits de vida sedentaris i el consum de dietes desequilibrades han propiciat que la prevalença de la NAFLD s'hagi incrementat durant els darrers anys (Asrih & Jornayvaz 2015). En aquesta línia, l'administració d'una dieta hiperlipídica a rates mascle i femella com a eina per a la inducció de lipotoxicitat al fetge ens ha permès avaluar el dimorfisme sexual existent en el desenvolupament d'alteracions hepàtiques. Hem comprovat que les rates femella mostren una major resistència a patir els efectes perjudicials de la dieta hiperlipídica. De fet, les femelles presenten un millor perfil lipídic circulat i una major sensibilitat a la insulina que els mascles. Paral·lelament, l'acumulació intracel·lular de lípids al fetge és també menor a les femelles com a resultat de l'augment de l'oxidació d'àcids grassos que compensa l'elevada disponibilitat d'aquests metabòlits per efecte de la dieta hiperlipídica. El perfil lipídic més saludable que presenten les femelles indicaria un ús més efectiu dels àcids grassos, acompanyat possiblement d'una major captació per part dels hepatòcits. Aquest dimorfisme sexual i la implicació de l'E2 en la disminució de l'acumulació intrahepàtica de lípids es reafirma als experiments realitzats amb cèl·lules HepG2 tractades amb palmitat, en els quals hem observat l'efecte de l'E2 regulant l'expressió de gens involucrats al metabolisme lipídic. Cal destacar que, tant al fetge de les rates femella com a les cèl·lules HepG2 tractades amb E2, es produeix una activació d'AMPK en resposta a la major disponibilitat de combustibles lipídics. A més a més, la suplementació amb E2 a les rates ovariectomitzades també suposa l'activació d'aquesta cinasa, de manera que l'AMPK podria constituir un element clau en els efectes de l'hormona sobre el metabolisme lipídic. L'AMPK és un sensor metabòlic de la cèl·lula, que activa les vies catabòliques per generar ATP i inhibeix les anabòliques per estalviar energia (Viollet *et al.* 2009). En aquesta línia, la inhibició d'AMPK anul·la els canvis que genera l'hormona sobre l'expressió de

gens implicats al metabolisme lipídic, i en conseqüència, l'E2 perd la capacitat de disminuir l'esteatosi hepàtica. D'aquesta manera, hem identificat l'AMPK com a un element intermediari clau dels efectes beneficiosos de l'E2. Aquests resultats estarien d'acord amb la idea que l'activació d'AMPK seria una estratègia viable per fer front a la NAFLD (Smith *et al.* 2016). Els nostres resultats, a més, aporten noves evidències en relació als mecanismes subjacents al dimorfisme sexual existent en la progressió de l'esteatosi. Cal comentar que l'AMPK, a través de la fosforilació i activació dels PGCs, també està implicada en la regulació de la funció mitocondrial als hepatòcits (Villena 2015). Per tant, seria interessant la realització de futurs estudis sobre l'activitat funcional dels PGCs per tal d'investigar si l'AMPK es troba directament involucrada en els canvis observats en la biogènesi i la funció mitocondrials produïts per l'E2.

Els efectes de l'E2 sobre la funció i la biogènesi mitocondrials al fetge, posen de manifest que la major resistència de les rates femella a patir els efectes lipotòxics del tractament dietètic podria anar lligada, almenys en part, al manteniment de l'homeòstasi mitocondrial. Les adaptacions metabòliques per fer front a l'elevada disponibilitat d'àcids grassos, com l'increment de la seva oxidació, semblen no ser suficients per reduir l'acumulació de greix que es dona en aquest teixit. De fet, l'activitat de la cadena de transport electrònic està alterada, de manera que es generen ROS i s'afavoreix la progressió de lesions hepàtiques (Begrache *et al.* 2013). Als hepatòcits HepG2, l'E2 no només està implicat en la reducció de l'acumulació de greix a través de l'activació de l'oxidació dels àcids grassos, sinó també en la reversió parcial de les deficiències de la cadena de transport electrònic i en la disminució de la producció de ROS. Així, l'augment en paral·lel de l'oxidació dels àcids grassos i el funcionament efectiu de la cadena de transport electrònic assegura que ambdós processos estiguin en equilibri i, en conseqüència, els hepatòcits estiguin més protegits enfront de la progressió de l'esteatosi.

L'acumulació intrahepàtica de determinades espècies lipídiques, com els diacilglicerols o les ceramides, es relaciona amb el desenvolupament de resistència hepàtica a la insulina, tot i que altres senyals també poden estar implicades en aquest efecte (Gruben *et al.* 2014). Entre aquestes senyals, cal destacar l'activació de la JNK, que a més de ser una de les principals vies involucrades en la inflamació al fetge (Gruben *et al.* 2014), s'associa amb la disminució de la senyalització hepàtica de la insulina (Singh *et al.* 2009; Seki *et al.* 2012). Així, la participació de JNK en la inflamació i en la resistència a la insulina fa d'aquesta proteïna un element central en la disfunció de l'hepatòcit i en la progressió de l'esteatosi cap a situacions més lesives. A les rates femella, l'alimentació amb la dieta hiperlipídica no altera la sensibilitat hepàtica a la insulina, la qual cosa s'acompanya d'una menor activació de JNK. Cal fer esment que a les rates ovariectomitzades i als hepatòcits HepG2, ambdós tractats amb E2, també s'observa una menor activació d'aquesta MAPK. Així, JNK podria constituir un punt susceptible de regulació pels estrògens, i contribuiria a la major resistència de les femelles a la disfunció metabòlica induïda pel tractament dietètic. Entre les senyals que provoquen l'activació de JNK, cal destacar les ROS, espècies reactives que es produeixen majoritàriament als mitocondris (Seki *et al.* 2012). Per tant, els efectes beneficiosos de l'E2 sobre el manteniment de la sensibilitat hepàtica a la insulina en condicions lipotòxiques vendrien determinats per l'estimulació de la funció mitocondrial i la disminució de la producció de ROS, fets que disminuirien l'activació de JNK. Així doncs, l'E2 seria un factor destacat en la connexió entre la funció mitocondrial i la sensibilitat a la insulina al fetge a través de la modulació de JNK, de manera que el manteniment d'una població mitocondrial sana i amb baixa producció de ROS evitaria l'activació de vies inflamàtores i la interrupció de la senyalització de la insulina induïdes per una dieta hiperlipídica. Aquestes consideracions reafirmen la importància del correcte funcionament mitocondrial en la preservació de la funció de l'hepatòcit, alhora que reforcen la idea de dissenyar tractaments focalitzats en el manteniment de l'homeòstasi mitocondrial

per tal de frenar o revertir la progressió d'alteracions hepàtiques (Auger *et al.* 2015).

Per avançar en el coneixement dels mecanismes implicats en el dimorfisme sexual en la disfunció metabòlica al fetge, es va plantejar un disseny experimental que incloïa rates d'ambdós sexes alimentades amb dieta hiperlipídica suplementada o no amb rosiglitazona, per tal d'estudiar els canvis que genera aquest fàrmac sobre l'hepatòcit lipotòxic, i si aquestes modificacions són dependents del sexe. Les TZDs, entre elles la rosiglitazona, són un grup de fàrmacs que actuen principalment al teixit adipós, on augmenten la sensibilitat a la insulina i promouen la diferenciació dels adipòcits, augmentant la seva capacitat d'emmagatzemar lípids i evitant així que siguin captats pel fetge (Tontonoz & Spiegelman 2008). A més, les TZDs estimulen l'expressió i secreció d'adiponectina, adipocina que augmenta la sensibilitat a la insulina i que presenta efectes protectors al fetge àmpliament reconeguts (Silva *et al.* 2014). Els nostres resultats posen de manifest que els canvis induïts pel tractament amb rosiglitazona sobre el perfil metabòlic del fetge lipotòxic són considerablement més notoris a les rates mascle, evidenciats per una millora de la sensibilitat hepàtica a la insulina i de la funció mitocondrial, i per una reducció de l'esteatosi i de l'estrès oxidatiu. Aquestes diferències entre sexes estarien associades al grau de disfunció metabòlica induït pel tractament dietètic, atès que s'ha descrit que els efectes del fàrmac són més acusats en situacions de resistència a la insulina i de hiperlipèmia (Day 1999; Olefsky 2000). Així mateix, l'adiponectina participaria, almenys en part, en aquestes accions, la qual cosa està d'acord amb l'augment dels seus nivells sèrics i amb l'activació de la seva via de senyalització en ambdós sexes al fetge en resposta al tractament farmacològic. L'adiponectina té un impacte rellevant en la preservació de la funció mitocondrial, de l'esteatosi i de la progressió d'alteracions hepàtiques (Zhou *et al.* 2008), accions que la situen com una molècula rellevant en la protecció de la disfunció metabòlica de l'hepatòcit.

En conjunt, els resultats de la present tesi doctoral posen de manifest que els estrògens, i en concret l'E2, actuen com a moduladors de la funció i la biogènesi mitocondrials, i de l'estrès oxidatiu al fetge. A més, hem descrit una regulació de l'expressió de gens implicats al metabolisme lipídic per part de l'hormona. Aquests efectes hormonals resulten particularment rellevants en un context lipotòxic, ja que s'associen amb la protecció de l'hepatòcit enfront de l'esteatosi, l'estrès oxidatiu i la resistència hepàtica a la insulina. L'ampli rang d'efectes beneficiosos de l'E2 sobre el fetge aporta nous coneixements sobre els mecanismes implicats en el dimorfisme sexual en la prevalença de lesions hepàtiques. Finalment, els resultats recolzen l'ús de teràpies encaminades al manteniment de l'homeòstasi mitocondrial en la prevenció i tractament de l'esteatosi o la resistència a la insulina hepàtiques.

6. CONCLUSIONS

- I. El dimorfisme sexual descrit en el funcionament mitocondrial del fetge de rata depèn, en part, dels efectes estimuladors de l'estradiol, els quals són mediats principalment pel coactivador transcripcional PGC-1 β .
- II. Els efectes de l'estradiol estimulants la funció i la biogènesi mitocondrials es donen també a l'hepatòcit en condicions de lipotoxicitat. A les rates femella alimentades amb la dieta hiperlipídica, el manteniment d'una població mitocondrial saludable explicaria la protecció que mostra aquest sexe enfront de la disfunció metabòlica hepàtica induïda pel tractament dietètic.
- III. En una situació d'elevada disponibilitat de combustibles lipídics, el fetge de les rates femella així com els hepatòcits HepG2 tractats amb estradiol, presenten un augment de l'expressió de gens implicats en la captació, oxidació i secreció d'àcids grassos, i una disminució de l'expressió de gens lipogènics. L'activació de l'AMPK hepàtica constituïria un mecanisme intermediari clau en aquests efectes per part de l'estradiol i explicaria la menor esteatosi induïda per la dieta hiperlipídica al fetge de les rates femella en comparació a les mascles.
- IV. L'estradiol redueix l'activació hepàtica de la JNK, tant en situació control com de lipotoxicitat, restablint en aquest darrer cas la sensibilitat hepàtica a la insulina. Els efectes beneficiosos de l'estradiol vendrien determinats per una disminució de la producció de ROS, associada a una millora de la funció mitocondrial, que disminuiria l'activació de la JNK. El manteniment d'una població mitocondrial funcional, amb baixa producció de ROS, evitaria l'activació de les vies inflamatòries i la interrupció de la senyalització de la insulina induïdes pels estímuls lipotòxics.

- V. Existeixen diferències entre sexes en la resposta al tractament amb rosiglitazona. Els canvis induïts pel fàrmac són més accentuats al fetge de les rates mascle i consisteixen en un increment de la sensibilitat a la insulina i de la funció mitocondrial, i una reducció de l'esteatosi i de l'estrès oxidatiu. Aquesta resposta més manifesta dels mascles a la rosiglitazona estaria relacionada amb el major grau de disfunció metabòlica que indueix el tractament dietètic en aquest sexe.

7. REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

- Abdelmegeed MA, Yoo SH, Henderson LE, Gonzalez FJ, Woodcroft KJ & Song BJ 2011 PPAR α expression protects male mice from high fat-induced nonalcoholic fatty liver. *Journal of Nutrition* **141** 603–610. (doi:10.3945/jn.110.135210)
- Ahmed-Sorour H & Bailey CJ 1981 Role of ovarian hormones in the long-term control of glucose homeostasis, glycogen formation and gluconeogenesis. *Annals of Nutrition & Metabolism* **25** 208–212. (doi:10.1159/000176496)
- Alexeyev M, Shokolenko I, Wilson G & LeDoux S 2013 The maintenance of mitochondrial DNA integrity—critical analysis and update. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **5** a012641. (doi:10.1101/cshperspect.a012641)
- Amengual-Cladera E, Lladó I, Gianotti M & Proenza AM 2012a Sex differences in the effect of high-fat diet feeding on rat white adipose tissue mitochondrial function and insulin sensitivity. *Metabolism: Clinical and Experimental* **61** 1108–1117. (doi:10.1016/j.metabol.2011.12.016)
- Amengual-Cladera E, Lladó I, Gianotti M & Proenza AM 2012b Retroperitoneal white adipose tissue mitochondrial function and adiponectin expression in response to ovariectomy and 17 β -estradiol replacement. *Steroids* **77** 659–665. (doi:10.1016/j.steroids.2012.02.012)
- Andreyev AY, Kushnareva YE, Murphy AN & Starkov AA 2015 Mitochondrial ROS metabolism: 10 years later. *Biochemistry (Mosc)* **80** 517–531. (doi:10.1134/S0006297915050028)
- Arkan MC, Hevener AL, Greten FR, Maeda S, Li ZW, Long JM, Wynshaw-Boris A, Poli G, Olefsky J & Karin M 2005 IKK- β links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nature Medicine* **11** 191–198. (doi:10.1038/nm1185)
- Asrih M & Jornayvaz FR 2013 Inflammation as a potential link between nonalcoholic fatty liver disease and insulin resistance. *The Journal of Endocrinology* **218** R25–R36. (doi:10.1530/JOE-13-0201)
- Asrih M & Jornayvaz FR 2015 Metabolic syndrome and nonalcoholic fatty liver disease: Is insulin resistance the link? *Molecular and Cellular Endocrinology* **418** 55–65. (doi:10.1016/j.mce.2015.02.018)
- Atshaves BP, Martin GG, Hostetler HA, McIntosh AL, Kier AB & Schroeder F 2010 Liver fatty acid-binding protein and obesity. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **21** 1015–1032. (doi:10.1016/j.jnutbio.2010.01.005)
- Auger C, Alhasawi A, Contavadoo M & Appanna VD 2015 Dysfunctional mitochondrial bioenergetics and the pathogenesis of hepatic disorders. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **3** 40. (doi:10.3389/fcell.2015.00040)
- Babbar M & Sheikh MS 2013 Metabolic stress and disorders related to alterations in mitochondrial fission or fusion. *Molecular and Cellular Pharmacology* **5** 109–133.
- Bartos L 1977 Vaginal impedance measurement used for mating in the rat. *Laboratory Animals* **11** 53–55. (doi:10.1258/00236777780959210)
- Basciano H, Federico L & Adeli K 2005 Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia. *Nutrition & Metabolism* **2**. (doi:10.1186/1743-7075-2-5)

- Bechmann LP, Hannivoort RA, Gerken G, Hotamisligil GS, Trauner M & Canbay A 2012 The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases. *Journal of Hepatology* **56** 952–964. (doi:10.1016/j.jhep.2011.08.025)
- Becker T, Böttlinger L & Pfanner N 2012 Mitochondrial protein import: from transport pathways to an integrated network. *Trends in Biochemical Sciences* **37** 85–91. (doi:10.1016/j.tibs.2011.11.004)
- Begrache K, Igoudjil A, Pessayre D & Fromenty B 2006 Mitochondrial dysfunction in NASH: Causes, consequences and possible means to prevent it. *Mitochondrion* **6** 1–28. (doi:10.1016/j.mito.2005.10.004)
- Begrache K, Massart J, Robin MA, Bonnet F & Fromenty B 2013 Mitochondrial adaptations and dysfunctions in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* **58** 1497–1507. (doi:10.1002/hep.26226)
- Bellafante E, Murzilli S, Salvatore L, Latorre D, Villani G & Moschetta A 2013 Hepatic-specific activation of peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 β protects against steatohepatitis. *Hepatology* **57** 1343–1356. (doi:10.1002/hep.26222)
- Besseiche A, Riveline JP, Gautier JF, Bréant B & Blondeau B 2015 Metabolic roles of PGC-1 α and its implications for type 2 diabetes. *Diabetes and Metabolism* **41** 347–357. (doi:10.1016/j.diabet.2015.02.002)
- Bhatti JS, Bhatti GK & Reddy PH 2016 Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in metabolic disorders – A step towards mitochondria based therapeutic strategies. *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Basis of Disease* **1863** 1066–1077. (doi:10.1016/j.bbadis.2016.11.010)
- Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S & Kalayci O 2012 Oxidative stress and antioxidant defense. *The World Allergy Organization Journal* **5** 9–19. (doi:10.1097/WOX.0b013e3182439613)
- Birkenfeld AL & Shulman GI 2014 Nonalcoholic fatty liver disease, hepatic insulin resistance, and type 2 Diabetes. *Hepatology* **59** 713–723. (doi:10.1002/hep.26672)
- Van der Bliek AM, Shen Q & Kawajiri S 2013 Mechanisms of mitochondrial fission and fusion. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **5** a011072. (doi:10.1101/cshperspect.a011072)
- Borrás C, Sastre J, García-Sala D, Lloret A, Pallardó FV & Viña J 2003 Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males. *Free Radical Biology and Medicine* **34** 546–552. (doi:10.1016/S0891-5849(02)01356-4)
- Borrás C, Gambini J, López-Grueso R, Pallardó FV & Viña J 2010 Direct antioxidant and protective effect of estradiol on isolated mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Basis of Disease* **1802** 205–211. (doi:10.1016/j.bbadis.2009.09.007)
- Boucher J, Kleinriders A & Kahn CR 2014 Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **6** a009191. (doi:10.1101/cshperspect.a009191)
- Bradford MM 1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72** 248–254. (doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3)

- Braunersreuther V, Viviani GL, Mach F & Montecucco F 2012 Role of cytokines and chemokines in non-alcoholic fatty liver disease. *World Journal of Gastroenterology* **18** 727-735. (doi:10.3748/wjg.v18.i8.727)
- Bronner M, Hertz R & Bar-Tana J 2004 Kinase-independent transcriptional co-activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha by AMP-activated protein kinase. *The Biochemical Journal* **384** 295-305. (doi:10.1042/BJ20040955)
- Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, Nuremberg P, Horton JD, Cohen JC, Grundy SM & Hobbs HH 2004 Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: Impact of ethnicity. *Hepatology* **40** 1387-1395. (doi:10.1002/hep.20466)
- Bryzgalova G, Gao H, Ahren B, Zierath JR, Galuska D, Steiler TL, Dahlman-Wright K, Nilsson S, Gustafsson JA, Efendic S *et al.* 2006 Evidence that oestrogen receptor- α plays an important role in the regulation of glucose homeostasis in mice: insulin sensitivity in the liver. *Diabetologia* **49** 588-597. (doi:10.1007/s00125-005-0105-3)
- Buzzetti E, Pinzani M & Tsochatzis EA 2016 The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism* **65** 1038-1048. (doi:10.1016/j.metabol.2015.12.012)
- Byrne CD & Targher G 2015 NAFLD: a multisystem disease. *Journal of Hepatology* **62** S47-S64. (doi:10.1016/j.jhep.2014.12.012)
- Cai D, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L, Lee J & Shoelson SE 2005 Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nature Medicine* **11** 183-190. (doi:10.1038/nm1166)
- Cameron RB, Beeson CC & Schnellmann RG 2016 Development of therapeutics that induce mitochondrial biogenesis for the treatment of acute and chronic degenerative diseases. *Journal of Medicinal Chemistry* **59** 10411-10434. (doi:10.1021/acs.jmedchem.6b00669)
- Cannon B & Nedergaard J 2004 Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiological Reviews* **84** 277-359. (doi:10.1152/physrev.00015.2003)
- Capllonch-Amer G, Sbert-Roig M, Galmés-Pascual BM, Proenza AM, Lladó I, Gianotti M & García-Palmer FJ 2014a Estradiol stimulates mitochondrial biogenesis and adiponectin expression in skeletal muscle. *Journal of Endocrinology* **221** 391-403. (doi:10.1530/JOE-14-0008)
- Capllonch-Amer G, Llado I, Proenza AM, García-Palmer FJ & Gianotti M 2014b Opposite effects of 17- β estradiol and testosterone on mitochondrial biogenesis and adiponectin synthesis in white adipocytes. *Journal of Molecular Endocrinology* **52** 203-214. (doi:10.1530/JME-13-0201)
- Catta-Preta M, Mendonca LS, Fraulob-Aquino J, Aguila MB & Mandarim-de-Lacerda CA 2011 A critical analysis of three quantitative methods of assessment of hepatic steatosis in liver biopsies. *Virchows Arch* **459** 477-485. (doi:10.1007/s00428-011-1147-1)
- Cejka D, Losert D & Wacheck V 2005 Short interfering RNA (siRNA): tool or therapeutic? *Clinical Science* **110** 47-58. (doi:10.1042/CS20050162)

- Chambers KT, Chen Z, Crawford PA, Fu X, Burgess SC, Lai L, Leone TC, Kelly DP & Finck BN 2012 Liver-specific PGC-1beta deficiency leads to impaired mitochondrial function and lipogenic response to fasting-refeeding. *PLoS ONE* **7** 1-9. (doi:10.1371/journal.pone.0052645)
- Chandel NS 2015 Evolution of mitochondria as signaling organelles. *Cell Metabolism* **22** 204-206. (doi:10.1016/j.cmet.2015.05.013)
- Chavez JA & Summers SA 2012 A ceramide-centric view of insulin resistance. *Cell Metabolism* **15** 585-594. (doi:10.1016/j.cmet.2012.04.002)
- Chen JQ & Yager JD 2004 Estrogen's effects on mitochondrial gene expression: mechanisms and potential contributions to estrogen carcinogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1028** 258-272. (doi:10.1196/annals.1322.030)
- Cheng KKY, Iglesias MÁ, Lam KSL, Wang Y, Sweeney G, Zhu W, Vanhoutte PM, Kraegen EW & Xu A 2009 APPL1 potentiates insulin-mediated inhibition of hepatic glucose production and alleviates diabetes via Akt activation in Mice. *Cell Metabolism* **9** 417-427. (doi:10.1016/j.cmet.2009.03.013)
- Chiquette E, Ramirez G & DeFronzo R 2004 A meta-analysis comparing the effect of thiazolidinediones on cardiovascular risk factors. *Archives of Internal Medicine* **164** 2097-2104. (doi:10.1001/archinte.164.19.2097)
- Chrzanowska-Lightowlers ZM, Turnbull DM & Lightowlers RN 1993 A microtiter plate assay for cytochrome c oxidase in permeabilized whole cells. *Analytical Biochemistry* **214** 45-49. (doi:10.1006/abio.1993.1454)
- Clark JM, Brancati FL & Diehl AM 2002 Nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* **122** 1649-1657. (doi:10.1016/j.bpg.2010.08.005)
- Cohen J, Horton J & Hobbs H 2011 Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science* **332** 1519-1523. (doi:10.1126/science.1204265.Human)
- Colom B, Alcolea M, Valle A, Oliver J, Roca P & García-Palmer FJ 2007 Skeletal muscle of female rats exhibit higher mitochondrial mass and oxidative-phosphorylative capacities compared to males. *Cellular Physiology and Biochemistry* **19** 205-212. (doi:10.1159/000099208)
- Cortez-Pinto H & Machado M V 2009 Uncoupling proteins and non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology* **50** 857-860. (doi:10.1016/j.jhep.2009.02.019)
- Cui W, Chen SL & Hu KQ 2010 Quantification and mechanisms of oleic acid-induced steatosis in HepG2 cells. *American Journal of Translational Research* **2** 95-104.
- Czaja MJ 2010 JNK regulation of hepatic manifestations of the metabolic syndrome. *Trends in Endocrinology and Metabolism* **21** 707-713. (doi:10.1016/j.tem.2010.08.010)
- D'Eon TM, Souza SC, Aronovitz M, Obin MS, Fried SK & Greenberg AS 2005 Estrogen regulation of adiposity and fuel partitioning: Evidence of genomic and non-genomic regulation of lipogenic and oxidative pathways. *Journal of Biological Chemistry* **280** 35983-35991. (doi:10.1074/jbc.M507339200)
- Day C 1999 Thiazolidinediones: a new class of antidiabetic drugs. *Diabetic Medicine: A Journal of the British Diabetic Association* **16** 179-192. (doi:10.1046/j.1464-5491.1999.00023.x)

- Day CP & James OFW 1998 Steatohepatitis: A tale of two 'hits'? *Gastroenterology* **114** 842-845. (doi:10.1016/S0016-5085(98)70599-2)
- Dighe AS & Sluss PM 2004 Improved detection of serum estradiol after sample extraction procedure. *Clinical Chemistry* **50** 764-766. (doi:10.1373/clinchem.2003.029553)
- Esterbauer H, Schaur RJ & Zollner H 1991 Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology & Medicine* **11** 81-128. (doi:10.1016/0891-5849(91)90192-6)
- Evans MJ, Lai K, Shaw LJ, Harnish DC & Chadwick CC 2002 Estrogen Receptor α inhibits IL-1 β induction of gene expression in the mouse liver. *Endocrinology* **143** 2559-2570. (doi:10.1210/endo.143.7.8919)
- Fabbrini E, Sullivan S & Klein S 2010 Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic and clinical implications. *Hepatology* **51** 679-689. (doi:10.1002/hep.23280)
- Fan JG & Cao HX 2013 Role of diet and nutritional management in non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* **28** 81-87. (doi:10.1111/jgh.12244)
- Fan W & Evans R 2015 PPARs and ERRs: molecular mediators of mitochondrial metabolism. *Current Opinion in Cell Biology* **33** 49-54. (doi:10.1016/j.ceb.2014.11.002)
- Farese R V, Zechner R, Newgard CB & Walther TC 2012 The problem of establishing relationships between hepatic steatosis and hepatic insulin resistance. *Cell Metabolism* **15** 570-573. (doi:10.1016/j.cmet.2012.03.004)
- Fernandez ML & Webb D 2008 The LDL to HDL cholesterol ratio as a valuable tool to evaluate coronary heart disease risk. *Journal of the American College of Nutrition* **27** 1-5. (doi:10.1080/07315724.2008.10719668)
- Fernández-Silva P, Enriquez JA & Montoya J 2003 Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA. *Experimental Physiology* **88** 41-56. (doi:10.1113/eph8802514)
- Folch J, Lees M & Stanley GHS 1957 A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry* **226** 497-509.
- De Francesco EM, Angelone T, Pasqua T, Pupo M, Cerra MC & Maggiolini M 2013 GPER mediates cardiotropic effects in spontaneously hypertensive rat hearts. *PLoS ONE* **8** e69322. (doi:10.1371/journal.pone.0069322)
- Frank A, Brown LM & Clegg DJ 2014 The role of hypothalamic estrogen receptors in metabolic regulation. *Frontiers in Neuroendocrinology* **35** 550-557. (doi:10.1016/j.yfrne.2014.05.002)
- Friedman JR & Nunnari J 2014 Mitochondrial form and function. *Nature* **505** 335-343. (doi:10.1038/nature12985)
- Fuhrman B 2012 Regulation of hepatic paraoxonase-1 expression. *Journal of Lipids* **2012** 684010. (doi:10.1155/2012/684010)

- Gaignard P, Savouroux S, Liere P, Pianos A, Therond P, Schumacher M, Slama A & Guennoun R 2015 Effect of sex differences on brain mitochondrial function and its suppression by ovariectomy and in aged mice. *Endocrinology* **156** 2893-2904. (doi:10.1210/en.2014-1913)
- Galbo T, Perry RJ, Jurczak MJ, Camporez JPG, Alves TC, Kahn M, Guigni BA, Serr J, Zhang D, Bhanot S *et al.* 2013 Saturated and unsaturated fat induce hepatic insulin resistance independently of TLR-4 signaling and ceramide synthesis in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110** 12780-12785. (doi:10.1073/pnas.1311176110)
- Gali Ramamoorthy T, Laverny G, Schlagowski AI, Zoll J, Messaddeq N, Bornert JM, Panza S, Ferry A, Geny B & Metzger D 2015 The transcriptional coregulator PGC-1 β controls mitochondrial function and anti-oxidant defence in skeletal muscles. *Nature Communications* **6** 10210. (doi:10.1038/ncomms10210)
- Galmés-Pascual BM, Nadal-Casellas A, Bauza-Thorbrügge M, Sbert-Roig M, García-Palmer FJ, Proenza AM, Gianotti M & Lladó I 2017 17 β -estradiol improves hepatic mitochondrial biogenesis and function through PGC1B. *Journal of Endocrinology* **232** 297-308. (doi:10.1530/JOE-16-0350)
- Gao Z, Hwang D, Bataille F, Lefevre M, York D, Quon MJ & Ye J 2002 Serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by inhibitor kappa B kinase complex. *The Journal of Biological Chemistry* **277** 48115-48121. (doi:10.1074/jbc.M209459200)
- Gao D, Nong S, Huang X, Lu Y, Zhao H, Lin Y, Man Y, Wang S, Yang J & Li J 2010 The effects of palmitate on hepatic insulin resistance are mediated by NADPH Oxidase 3-derived reactive oxygen species through JNK and p38MAPK pathways. *The Journal of Biological Chemistry* **285** 29965-29973. (doi:10.1074/jbc.M110.128694)
- Gao M, Ma Y, Alsaggar M & Liu D 2016 Dual outcomes of rosiglitazone treatment on fatty liver. *The AAPS Journal* **18** 1023-1031. (doi:10.1208/s12248-016-9919-9)
- García-Ruiz I, Rodríguez-Juan C, Díaz-Sanjuán T, Martínez MÁ, Muñoz-Yagüe T & Solís-Herruzo JA 2007 Effects of rosiglitazone on the liver histology and mitochondrial function in ob/ob mice. *Hepatology* **46** 414-423. (doi:10.1002/hep.21687)
- Gavrilova O, Haluzik M, Matsusue K, Cutson JJ, Johnson L, Dietz KR, Nicol CJ, Vinson C, Gonzalez FJ & Reitman ML 2003 Liver peroxisome proliferator-activated receptor gamma contributes to hepatic steatosis, triglyceride clearance, and regulation of body fat mass. *The Journal of Biological Chemistry* **278** 34268-34276. (doi:10.1074/jbc.M300043200)
- Geer EB & Shen W 2009 Gender differences in insulin resistance, body composition, and energy balance. *Gender Medicine* **6** 60-75. (doi:10.1016/j.genm.2009.02.002)
- Geisler CE, Hepler C, Higgins MR & Renquist BJ 2016 Hepatic adaptations to maintain metabolic homeostasis in response to fasting and refeeding in mice. *Nutrition & Metabolism* **13**. (doi:10.1186/s12986-016-0122-x)
- Gómez-Lechón MJ, Donato MT, Martínez-Romero A, Jiménez N, Castell JV & O'Connor JE 2007 A human hepatocellular in vitro model to investigate steatosis. *Chemico-Biological Interactions* **165** 106-116. (doi:10.1016/j.cbi.2006.11.004)

- Gómez-Pérez Y, Amengual-Cladera E, Català-Niell A, Thomàs-Moyà E, Gianotti M, Proenza AM & Lladó I 2008 Gender dimorphism in high-fat-diet-induced insulin resistance in skeletal muscle of aged rats. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology* **22** 539-548. (doi:10.1159/000185538)
- Gonzales GB, Van Camp J, Vissenaekens H, Raes K, Smagghe G & Grootaert C 2015 Review on the use of cell cultures to study metabolism, transport, and accumulation of flavonoids: from mono-cultures to co-culture systems. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **14** 741-754. (doi:10.1111/1541-4337.12158)
- Gruben N, Shiri-Sverdlov R, Koonen DPY & Hofker MH 2014 Nonalcoholic fatty liver disease: A main driver of insulin resistance or a dangerous liaison? *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* **1842** 2329-2343. (doi:10.1016/j.bbadis.2014.08.004)
- Guevara R, Santandreu FM, Valle A, Gianotti M, Oliver J & Roca P 2009 Sex-dependent differences in aged rat brain mitochondrial function and oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine* **46** 169-175. (doi:10.1016/j.freeradbiomed.2008.09.035)
- Guo C, Sun L, Chen X & Zhang D 2013a Oxidative stress, mitochondrial damage and neurodegenerative diseases. *Neural Regeneration Research* **8** 2003-2014. (doi:10.3969/j.issn.1673-5374.2013.21.009)
- Guo J, Duckles SP, Weiss JH, Li X & Krause DN 2013b 17 β -Estradiol prevents cell death and mitochondrial dysfunction by an estrogen receptor-dependent mechanism in astrocytes after oxygen-glucose deprivation/reperfusion. *Free Radical Biology & Medicine* **52** 2151-2160. (doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.03.005)
- Gupte AA, Pownall HJ & Hamilton DJ 2015 Estrogen: An Emerging Regulator of Insulin Action and Mitochondrial Function. *Journal of Diabetes Research* **2015** 1-9. (doi:10.1155/2015/916585)
- Hamaguchi M, Kojima T, Ohbora A, Takeda N, Fukui M & Kato T 2012 Aging is a risk factor of nonalcoholic fatty liver disease in premenopausal women. *World Journal of Gastroenterology* **18** 237-243. (doi:10.3748/wjg.v18.i3.237)
- Hamden K, Carreau S, Ellouz F, Masmoudi H & El Feki A 2007 Protective effect of 17beta-estradiol on oxidative stress and liver dysfunction in aged male rats. *Journal of Physiology and Biochemistry* **63** 195-201. (doi:10.1007/BF03165782)
- Han HS, Kang G, Kim JS, Choi BH & Koo SH 2016 Regulation of glucose metabolism from a liver-centric perspective. *Experimental & Molecular Medicine* **48** e218. (doi:10.1038/emm.2015.122)
- Hardie DG, Ross FA & Hawley SA 2012 AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **13** 251-262. (doi:10.1038/nrm3311)
- Hardy T, Oakley F, Anstee QM & Day CP 2016 Nonalcoholic fatty liver disease: pathogenesis and disease spectrum. *Annual Review of Pathology* **11** 451-496. (doi:10.1146/annurev-pathol-012615-044224)
- Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Görgün CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M & Hotamisligil GS 2002 A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* **420** 333-336. (doi:10.1038/nature01137)

- Hoekstra R & Chamuleau RAFM 2002 Recent developments on human cell lines for the bioartificial liver. *The International Journal of Artificial Organs* **25** 182–191.
- Hsieh YC, Yang S, Choudhry MA, Yu HP, Rue LW, Bland KI & Chaudry IH 2005 PGC-1 upregulation via estrogen receptors: a common mechanism of salutary effects of estrogen and flutamide on heart function after trauma-hemorrhage. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* **289** H2665–H2672. (doi:10.1152/ajpheart.00682.2005)
- Huang YY, Gusdon AM & Qu S 2013 Nonalcoholic fatty liver disease: molecular pathways and therapeutic strategies. *Lipids in Health and Disease* **12**. (doi:10.1186/1476-511X-12-171)
- Irazusta V, Moreno-Cermeño A, Cabisco E, Tamarit J & Ros J 2010 Proteomic strategies for the analysis of carbonyl groups on proteins. *Current Protein & Peptide Science* **11** 652–658. (doi:10.2174/138920310794557664)
- Ivanova MM, Radde BN, Son J, Mehta FF, Chung SH & Klinge CM 2013 Estradiol and tamoxifen regulate NRF-1 and mitochondrial function in mouse mammary gland and uterus. *Journal of Molecular Endocrinology* **51** 233–246. (doi:10.1530/JME-13-0051)
- Jäger S, Handschin C, St-Pierre J & Spiegelman BM 2007 AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 α . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104** 12017–12022. (doi:10.1073/pnas.0705070104)
- Javitt NB 1990 Hep G2 cells as a resource for metabolic studies: lipoprotein, cholesterol, and bile acids. *The FASEB Journal* **4** 161–168.
- Ji H, Lu RH, Chang ZG, Su SS & Yang GS 2012 PGC-1 β modulates the expression of genes involved in mitochondrial function and adipogenesis during preadipocyte differentiation. *Reproduction in Domestic Animals* **47** 419–427. (doi:10.1111/j.1439-0531.2011.01894.x)
- Jiang G, Dallas-Yang Q, Li Z, Szalkowski D, Liu F, Shen X, Wu M, Zhou G, Doebber T, Berger J *et al.* 2002 Potentiation of insulin signaling in tissues of Zucker obese rats after acute and long-term treatment with PPAR γ agonists. *Diabetes* **51** 2412–2419.
- Jitrapakdee S 2012 Transcription factors and coactivators controlling nutrient and hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **44** 33–45. (doi:10.1016/j.biocel.2011.10.001)
- Jornayvaz F & Shulman G 2010 Regulation of mitochondrial biogenesis. *Essays in Biochemistry* **47** 69–84. (doi:10.1042/bse0470069.Regulation)
- Justo R, Boada J, Frontera M, Oliver J, Bermúdez J & Gianotti M 2005a Gender dimorphism in rat liver mitochondrial oxidative metabolism and biogenesis. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* **289** C372–C378. (doi:10.1152/ajpcell.00035.2005)
- Justo R, Oliver J & Gianotti M 2005b Brown adipose tissue mitochondrial subpopulations show different morphological and thermogenic characteristics. *Mitochondrion* **5** 45–53. (doi:10.1016/j.mito.2004.09.003)

- Juurinen L, Kotronen A, Granér M & Yki-Järvinen H 2008 Rosiglitazone reduces liver fat and insulin requirements and improves hepatic insulin sensitivity and glycemic control in patients with type 2 diabetes requiring high insulin doses. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **93** 118–124. (doi:10.1210/jc.2007-1825)
- Kadowaki T & Yamauchi T 2005 Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocrine Reviews* **26** 439–451. (doi:10.1210/er.2005-0005)
- Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, Hara K, Ueki K & Tobe K 2006 Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *The Journal of Clinical Investigation* **116** 1784–1792. (doi:10.1172/JCI29126)
- Kantartzis K, Peter A, Machicao F, Machann J, Wagner S, Königsrainer I, Königsrainer A, Schick F, Fritsche A, Häring HU *et al.* 2009 Dissociation between fatty liver and insulin resistance in humans carrying a variant of the patatin-like phospholipase 3 gene. *Diabetes* **58** 2616–2623. (doi:10.2337/db09-0279)
- Kawano Y & Cohen DE 2013 Mechanisms of hepatic triglyceride accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Gastroenterology* **48** 434–441. (doi:10.1007/s00535-013-0758-5)
- Kemper MF, Stirone C, Krause DN, Duckles SP & Procaccio V 2014 Genomic and non-genomic regulation of PGC1 isoforms by estrogen to increase cerebral vascular mitochondrial biogenesis and reactive oxygen species protection. *European Journal of Pharmacology* **723** 322–329. (doi:10.1016/j.ejphar.2013.11.009)
- Kim HR, Won SJ, Fabian C, Kang MG, Szardenings M & Shin MG 2015 Mitochondrial DNA aberrations and pathophysiological implications in hematopoietic diseases, chronic inflammatory diseases, and cancers. *Annals of Laboratory Medicine* **35** 1–14. (doi:10.3343/alm.2015.35.1.1)
- Kimmel AR & Sztalryd C 2014 Perilipin 5, a lipid droplet protein adapted to mitochondrial energy utilization. *Current Opinion in Lipidology* **25** 110–117. (doi:10.1097/MOL.000000000000057)
- Klinge C 2001 Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Research* **29** 2905–2919. (doi:10.1093/nar/29.14.2905)
- Koolman J & Röhm KH 2004 *Bioquímica: Texto Y Atlas*. Madrid: Medica panamericana.
- Kucera O 2014 Experimental models of non-alcoholic fatty liver disease in rats. *World Journal of Gastroenterology* **20** 8364. (doi:10.3748/wjg.v20.i26.8364)
- Kuhl J, Hilding A, Östenson CG, Grill V, Efendic S & Bavenholm P 2005 Characterisation of subjects with early abnormalities of glucose tolerance in the Stockholm Diabetes Prevention Programme: the impact of sex and type 2 diabetes heredity. *Diabetologia* **48** 35–40. (doi:10.1007/s00125-004-1614-1)
- Lee MY, Jung SC, Lee JH & Han HJ 2008 Estradiol-17beta protects against hypoxia-induced hepatocyte injury through ER-mediated upregulation of Bcl-2 as well as ER-independent antioxidant effects. *Cell Research* **18** 491–499. (doi:10.1038/cr.2008.42)
- Lelliott CJ, Medina-Gomez G, Petrovic N, Kis A, Feldmann HM, Bjursell M, Parker N, Curtis K, Campbell M, Hu P *et al.* 2006 Ablation of PGC-1beta results in defective mitochondrial activity, thermogenesis, hepatic function, and cardiac performance. *PLoS Biology* **4** e369. (doi:10.1371/journal.pbio.0040369)

- Leung C, Rivera L, Furness JB & Angus PW 2016 The role of the gut microbiota in NAFLD. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* **13** 412–425. (doi:10.1038/nrgastro.2016.85)
- Levene AP, Kudo H, Armstrong MJ, Thursz MR, Gedroyc WM, Anstee QM & Goldin RD 2012 Quantifying hepatic steatosis – more than meets the eye. *Histopathology* **60** 971–981. (doi:10.1111/j.1365-2559.2012.04193.x)
- Li Y, Xu S, Mihaylova MM, Zheng B, Hou X, Jiang B, Park O, Luo Z, Lefai E, Shyy JYJ *et al.* 2011 AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin-resistant mice. *Cell Metabolism* **13** 376–388. (doi:10.1016/j.cmet.2011.03.009)
- Lin J, Tarr PT, Yang R, Rhee J, Puigserver P, Newgard CB & Spiegelman BM 2003 PGC-1 β in the regulation of hepatic glucose and energy metabolism. *The Journal of Biological Chemistry* **278** 30843–30848. (doi:10.1074/jbc.M303643200)
- Lin J, Yang R, Tarr PT, Wu PH, Handschin C, Li S, Yang W, Pei L, Uldry M, Tontonoz P *et al.* 2005 Hyperlipidemic effects of dietary saturated fats mediated through PGC-1 β coactivation of SREBP. *Cell* **120** 261–273. (doi:10.1016/j.cell.2004.11.043)
- Liu C & Lin JD 2011 PGC-1 coactivators in the control of energy metabolism. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* **43** 248–257. (doi:10.1093/abbs/gmr007)
- Mattingly KA, Ivanova MM, Riggs KA, Wickramasinghe NS, Barch MJ & Klinge CM 2008 Estradiol stimulates transcription of nuclear respiratory factor-1 and increases mitochondrial biogenesis. *Molecular Endocrinology* **22** 609–622. (doi:10.1210/me.2007-0029)
- Monteiro R, Teixeira D & Calhau C 2014 Estrogen signaling in metabolic inflammation. *Mediators of Inflammation* **2014** 615917. (doi:10.1155/2014/615917)
- Morán-Salvador E, López-Parra M, García-Alonso V, Titos E, Martínez-Clemente M, González-Pérez A, López-Vicario C, Barak Y, Arroyo V & Clària J 2011 Role for PPAR γ in obesity-induced hepatic steatosis as determined by hepatocyte- and macrophage-specific conditional knockouts. *The FASEB Journal* **25** 2538–2550. (doi:10.1096/fj.10-173716)
- Moreno FN, Campos-Shimada LB, da Costa SC, Garcia RF, Cecchini AL, Natali MRM, Vitoriano ADS, Ishii-Iwamoto EL & Salgueiro-Pagadigorria CL 2015 Vitex agnus-castus L. (Verbenaceae) improves the liver lipid metabolism and redox state of ovariectomized rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2015** 212378. (doi:10.1155/2015/212378)
- Mulder P, Morrison MC, Verschuren L, Liang W, van Bockel JH, Kooistra T, Wielinga PY & Kleemann R 2016 Reduction of obesity-associated white adipose tissue inflammation by rosiglitazone is associated with reduced non-alcoholic fatty liver disease in LDLr-deficient mice. *Scientific Reports* **6** 31542. (doi:10.1038/srep31542)
- Murphy MP 2009 How mitochondria produce reactive oxygen species. *The Biochemical Journal* **417** 1–13. (doi:10.1042/BJ20081386)

- Nadal-Casellas A, Amengual-Cladera E, Proenza AM, Lladó I & Gianotti M 2010 Long-term high-fat-diet feeding impairs mitochondrial biogenesis in liver of male and female rats. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology* **26** 291-302. (doi:10.1159/000320552)
- Nadal-Casellas A, Proenza AM, Lladó I & Gianotti M 2011 Effects of ovariectomy and 17- β estradiol replacement on rat brown adipose tissue mitochondrial function. *Steroids* **76** 1051-1056. (doi:10.1016/j.steroids.2011.04.009)
- Nadal-Casellas A, Proenza AM, Lladó I & Gianotti M 2012 Sex-dependent differences in rat hepatic lipid accumulation and insulin sensitivity in response to diet-induced obesity. *Biochemistry and Cell Biology* **90** 164-172. (doi:10.1139/o11-069)
- Nadal-Casellas A, Bauzá-Thorbrügge M, Proenza AM, Gianotti M & Lladó I 2013 Sex-dependent differences in rat brown adipose tissue mitochondrial biogenesis and insulin signaling parameters in response to an obesogenic diet. *Molecular and Cellular Biochemistry* **373** 125-135. (doi:10.1007/s11010-012-1481-x)
- Nagamine MK, da Silva TC, Matsuzaki P, Pinello KC, Cogliati B, Pizzo CR, Akisue G, Haraguchi M, Górnaiak SL, Sinhorini IL *et al.* 2009 Cytotoxic effects of butanolic extract from *Pfaffia paniculata* (Brazilian ginseng) on cultured human breast cancer cell line MCF-7. *Experimental and Toxicologic Pathology* **61** 75-82. (doi:10.1016/j.etp.2008.01.017)
- Nakano K, Tarashima M, Tachikawa E, Noda N, Nakayama T, Sasaki K, Mizoguchi E, Matsuzaki M & Osawa M 2005 Platelet mitochondrial evaluation during cytochrome c and dichloroacetate treatments of MELAS. *Mitochondrion* **5** 426-433. (doi:10.1016/j.mito.2005.10.002)
- Nakatani Y, Kaneto H, Kawamori D, Hatazaki M, Miyatsuka T, Matsuoka TA, Kajimoto Y, Matsuhisa M, Yamasaki Y & Hori M 2004 Modulation of the JNK pathway in liver affects insulin resistance status. *The Journal of Biological Chemistry* **279** 45803-45809. (doi:10.1074/jbc.M406963200)
- Nassir F & Ibdah JA 2014 Role of mitochondria in nonalcoholic fatty liver disease. *International Journal of Molecular Sciences* **15** 8713-8742. (doi:10.3390/ijms15058713)
- Nigro E, Scudiero O, Monaco ML, Palmieri A, Mazzarella G, Costagliola C, Bianco A & Daniele A 2014a New insight into adiponectin role in obesity and obesity-related diseases. *BioMed Research International* **2014** 658913. (doi:10.1155/2014/658913)
- Nigro M, Santos AT, Barthem CS, Louzada RAN, Fortunato RS, Ketzer LA, Carvalho DP & De Meis L 2014b A change in liver metabolism but not in brown adipose tissue thermogenesis is an early event in ovariectomy-induced obesity in rats. *Endocrinology* **155** 2881-2891. (doi:10.1210/en.2013-1385)
- Olde B & Leeb-Lundberg LMF 2009 GPR30/GPER1: searching for a role in estrogen physiology. *Trends in Endocrinology and Metabolism* **20** 409-416. (doi:10.1016/j.tem.2009.04.006)
- Olefsky JM 2000 Treatment of insulin resistance with peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *The Journal of Clinical Investigation* **106** 467-472. (doi:10.1172/JCI10843)

- Opie L & Newsholme E 1967 The activities of fructose 1,6-diphosphatase, phosphofructokinase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in white muscle and red muscle. *Biochemical Journal* **103** 391–399. (doi:10.1042/bj1030391)
- Pagliassotti MJ 2012 Endoplasmic reticulum stress in nonalcoholic fatty liver disease. *Annual Review of Nutrition* **32** 17–33. (doi:10.1146/annurev-nutr-071811-150644)
- Pan JJ & Fallon MB 2014 Gender and racial differences in nonalcoholic fatty liver disease. *World Journal of Hepatology* **6** 274–283. (doi:10.4254/wjh.v6.i5.274)
- Pantaleão TU, Mousovich F, Rosenthal D, Padrón AS, Carvalho DP & Costa VMC Da 2010 Effect of serum estradiol and leptin levels on thyroid function, food intake and body weight gain in female Wistar rats. *Steroids* **75** 638–642. (doi:10.1016/j.steroids.2010.03.009)
- Paquette A, Wang D, Jankowski M, Gutkowska J & Lavoie JM 2008 Effects of ovariectomy on PPAR α , SREBP-1c, and SCD-1 gene expression in the rat liver. *Menopause* **15** 1169–1175. (doi:10.1097/gme.0b013e31817b8159)
- Paquette A, Chapados NA, Bergeron R & Lavoie JM 2009 Fatty acid oxidation is decreased in the liver of ovariectomized rats. *Hormone and Metabolic Research* **41** 511–515. (doi:10.1055/s-0029-1202348)
- Paradies G, Paradies V, Ruggiero FM & Petrosillo G 2014 Oxidative stress, cardiolipin and mitochondrial dysfunction in nonalcoholic fatty liver disease. *World Journal of Gastroenterology* **20** 14205–14218. (doi:10.3748/wjg.v20.i39.14205)
- Pardo R, Enguix N, Lasheras J, Feliu JE, Kralli A & Villena JA 2011 Rosiglitazone-induced mitochondrial biogenesis in white adipose tissue is independent of peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α . *PLoS ONE* **6** e26989. (doi:10.1371/journal.pone.0026989)
- Park JY, Kim Y, Im JA & Lee H 2015 Oligonol suppresses lipid accumulation and improves insulin resistance in a palmitate-induced in HepG2 hepatocytes as a cellular steatosis model. *BMC Complementary and Alternative Medicine* **15**. (doi:10.1186/s12906-015-0709-1)
- Pawlak M, Lefebvre P & Staels B 2015 Molecular mechanism of PPAR α action and its impact on lipid metabolism, inflammation and fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology* **62** 720–733. (doi:10.1016/j.jhep.2014.10.039)
- Perry RJ, Samuel VT, Petersen KF & Shulman GI 2014 The role of hepatic lipids in hepatic insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* **510** 84–91. (doi:10.1038/nature13478)
- Pessayre D & Fromenty B 2005 NASH: a mitochondrial disease. *Journal of Hepatology* **42** 928–940. (doi:10.1016/j.jhep.2005.03.004)
- Petit JM, Maftah A, Ratinaud MH & Julien R 1992 10N-nonyl acridine orange interacts with cardiolipin and allows the quantification of this phospholipid in isolated mitochondria. *The FEBS Journal* **209** 267–273. (doi:10.1111/j.1432-1033.1992.tb17285.x)
- Pettinelli P, Del Pozo T, Araya J, Rodrigo R, Araya AV, Smok G, Csendes A, Gutierrez L, Rojas J, Korn O *et al.* 2009 Enhancement in liver SREBP-1c/PPAR-alpha ratio and steatosis in obese patients: correlations with insulin resistance and n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid depletion. *Biochimica et Biophysica Acta* **1792** 1080–1086. (doi:10.1016/j.bbadis.2009.08.015)

- Pham XH, Farge G, Shi Y, Gaspari M, Gustafsson CM & Falkenberg M 2006 Conserved sequence box II directs transcription termination and primer formation in mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry* **281** 24647-24652. (doi:10.1074/jbc.M602429200)
- Prossnitz ER & Barton M 2011 The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease. *Nature Reviews Endocrinology* **7** 715-726. (doi:10.1038/nrendo.2011.122)
- Puigserver P & Spiegelman BM 2003 Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocrine Reviews* **24** 78-90. (doi:10.1210/er.2002-0012)
- Qiao L, Zou C, van der Westhuyzen DR & Shao J 2008 Adiponectin reduces plasma triglyceride by increasing VLDL triglyceride catabolism. *Diabetes* **57** 1824-1833. (doi:10.2337/db07-0435)
- Quick KL, Hardt JI & Dugan LL 2000 Rapid microplate assay for superoxide scavenging efficiency. *Journal of Neuroscience Methods* **97** 139-144. (doi:10.1016/S0165-0270(00)00179-5)
- Rakhshandehroo M, Knoch B, Müller M & Kersten S 2010 Peroxisome proliferator-activated R receptor alpha target genes. *PPAR Research* **2010** 1-20. (doi:10.1155/2010/612089)
- Ramachandran A, Basu U, Sultana S, Nandakumar D & Patel SS 2017 Human mitochondrial transcription factors TFAM and TFB2M work synergistically in promoter melting during transcription initiation. *Nucleic Acids Research* **45** 861-874. (doi:10.1093/nar/gkw1157)
- Rines AK, Sharabi K, Tavares CDJ & Puigserver P 2016 Targeting hepatic glucose metabolism in the treatment of type 2 diabetes. *Nature Reviews. Drug Discovery* **15** 786-804. (doi:10.1038/nrd.2016.151)
- Rodgers JT, Lerin C, Haas W, Gygi SP, Spiegelman BM & Puigserver P 2005 Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 α and SIRT1. *Nature* **434** 113-118. (doi:10.1038/nature03354)
- Rojas C, Pan-Castillo B, Valls C, Pujadas G, Garcia-Vallve S, Arola L & Mulero M 2014 Resveratrol enhances palmitate-induced ER stress and apoptosis in cancer cells. *PLoS ONE* **9** e113929. (doi:10.1371/journal.pone.0113929)
- Ruan H & Dong LQ 2016 Adiponectin signaling and function in insulin target tissues. *Journal of Molecular Cell Biology* **8** 101-109. (doi:10.1093/jmcb/mjw014)
- Rui L 2014 Energy metabolism in the liver. *Comprehensive Physiology* **4** 177-197. (doi:10.1002/cphy.c130024)
- Ruiz-Larrea MB, Leal AM, Martín C, Martínez R & Lacort M 1997 Antioxidant action of estrogens in rat hepatocytes. *Revista Española de Fisiología* **53** 225-229.
- Ryu J, Galan AK, Xin X, Dong F, Abdul-Ghani MA, Zhou L, Wang C, Li C, Holmes BM, Sloane LB *et al.* 2014 APPL1 potentiates insulin sensitivity by facilitating the binding of IRS1/2 to the insulin receptor. *Cell Reports* **7** 1227-1238. (doi:10.1016/j.celrep.2014.04.006)

- Saha JK, Xia J, Grondin JM, Engle SK & Jakubowski JA 2005 Acute hyperglycemia induced by ketamine/xylazine anesthesia in rats: mechanisms and implications for preclinical models. *Experimental Biology and Medicine* **230** 777-784. (doi:10.1177/153537020523001012)
- Sazanov LA 2015 A giant molecular proton pump: structure and mechanism of respiratory complex I. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **16** 375-388. (doi:10.1038/nrm3997)
- Sbert-Roig M, Bauzá-Thorbrügge M, Galmés-Pascual BM, Capllonch-Amer G, García-Palmer FJ, Lladó I, Proenza AM & Gianotti M 2016 GPER mediates the effects of 17 β -estradiol in cardiac mitochondrial biogenesis and function. *Molecular and Cellular Endocrinology* **420** 116-124. (doi:10.1016/j.mce.2015.11.027)
- Scaduto RC & Grotyohann LW 1999 Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives. *Biophysical Journal* **76** 469-477. (doi:10.1016/S0006-3495(99)77214-0)
- Scarpulla RC 2008 Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiological Reviews* **88** 611-638. (doi:10.1152/physrev.00025.2007)
- Scarpulla RC 2011 Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network. *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Cell Research* **1813** 1269-1278. (doi:10.1016/j.bbamcr.2010.09.019)
- Scarpulla RC, Vega RB & Kelly DP 2012 Transcriptional integration of mitochondrial biogenesis. *Trends in Endocrinology and Metabolism* **23** 459-466. (doi:10.1016/j.tem.2012.06.006)
- Schadinger SE, Bucher NLR, Schreiber BM & Farmer SR 2005 PPAR γ 2 regulates lipogenesis and lipid accumulation in steatotic hepatocytes. *American Journal of Physiology – Endocrinology And Metabolism* **288** E1195-E1205. (doi:10.1152/ajpendo.00513.2004)
- Sedlak TW, Saleh M, Higginson DS, Paul BD, Juluri KR & Snyder SH 2009 Bilirubin and glutathione have complementary antioxidant and cytoprotective roles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106** 5171-5176. (doi:10.1073/pnas.0813132106)
- Seki E, Brenner DA & Karin M 2012 A liver full of JNK: Signaling in regulation of cell function and disease pathogenesis, and clinical approaches. *Gastroenterology* **143** 307-320. (doi:10.1053/j.gastro.2012.06.004.A)
- Shi Y, Dierckx A, Wanrooij PH, Wanrooij S, Larsson NG, Wilhelmsson LM, Falkenberg M & Gustafsson CM 2012 Mammalian transcription factor A is a core component of the mitochondrial transcription machinery. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109** 16510-16515. (doi:10.1073/pnas.1119738109)
- Silva TE, Colombo G & Schiavon LL 2014 Adiponectin: A multitasking player in the field of liver diseases. *Diabetes & Metabolism* **40** 95-107. (doi:10.1016/j.diabet.2013.11.004)
- Singh R, Wang Y, Xiang Y, Tanaka KE, Gaarde WA & Czaja MJ 2009 Differential effects of JNK1 and JNK2 inhibition on murine steatohepatitis and insulin resistance. *Hepatology* **49** 87-96. (doi:10.1002/hep.22578)

- Singh S, Khera R, Allen AM, Murad MH & Loomba R 2015 Comparative effectiveness of pharmacological interventions for nonalcoholic steatohepatitis: A systematic review and network meta-analysis. *Hepatology* **62** 1417–1432. (doi:10.1002/hep.27999)
- Smith BK, Marcinko K, Desjardins EM, Lally JS, Ford RJ & Steinberg GR 2016 Treatment of nonalcoholic fatty liver disease: role of AMPK. *American Journal of Physiology – Endocrinology And Metabolism* **311** E730–E740. (doi:10.1152/ajpendo.00225.2016)
- Sonoda J, Mehl IR, Chong LW, Nofsinger RR & Evans RM 2007 PGC-1 β controls mitochondrial metabolism to modulate circadian activity, adaptive thermogenesis, and hepatic steatosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104** 5223–5228. (doi:10.1073/pnas.0611623104)
- Ståhlberg N, Rico-Bautista E, Fisher RM, Wu X, Cheung L, Flores-Morales A, Tybring G, Norstedt G & Tollet-Egnell P 2004 Female-predominant expression of fatty acid translocase/CD36 in rat and human liver. *Endocrinology* **145** 1972–1979. (doi:10.1210/en.2003–0874)
- Stienstra R, Mandard S, Patsouris D, Maass C, Kersten S & Müller M 2007 Peroxisome proliferator-activated receptor alpha protects against obesity-induced hepatic inflammation. *Endocrinology* **148** 2753–2763. (doi:10.1210/en.2007–0014)
- Stirone C, Duckles SP, Krause DN & Procaccio V 2005 Estrogen increases mitochondrial efficiency and reduces oxidative stress in cerebral blood vessels. *Molecular Pharmacology* **68** 959–965. (doi:10.1124/mol.105.014662)
- Stöppeler S, Palmes D, Fehr M, Hölzen JP, Zibert A, Siaj R, Schmidt HHJ, Spiegel HU & Bahde R 2013 Gender and strain-specific differences in the development of steatosis in rats. *Laboratory Animals* **47** 43–52. (doi:10.1177/0023677212473717)
- Suzuki A & Abdelmalek MF 2009 Nonalcoholic fatty liver disease in women. *Women's Health* **5** 191–203. (doi:10.2217/17455057.5.2.191)
- Szmulowicz ED, Stuenkel CA & Seely EW 2009 Influence of menopause on diabetes and diabetes risk. *Nature Reviews Endocrinology* **5** 553–558. (doi:10.1038/nrendo.2009.166)
- Tang X, Luo YX, Chen HZ & Liu DP 2014 Mitochondria, endothelial cell function, and vascular diseases. *Frontiers in Physiology* **5** 175. (doi:10.3389/fphys.2014.00175)
- Tateya S, Rizzo-De Leon N, Handa P, Cheng AM, Morgan-Stevenson V, Ogimoto K, Kanter JE, Bornfeldt KE, Daum G, Clowes AW *et al.* 2013 VASP increases hepatic fatty acid oxidation by activating AMPK in mice. *Diabetes* **62** 1913–1922. (doi:10.2337/db12–0325)
- Tiikkainen M, Häkkinen AM, Korshennikova E, Nyman T, Mäkimattila S & Yki-Järvinen H 2004 Effects of rosiglitazone and metformin on liver fat content, hepatic insulin resistance, insulin clearance, and gene expression in adipose tissue in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* **53** 2169–2176. (doi:10.2337/diabetes.53.8.2169)
- Tilg H & Moschen AR 2010 Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: The multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology* **52** 1836–1846. (doi:10.1002/hep.24001)

- Tontonoz P & Spiegelman BM 2008 Fat and beyond: the diverse biology of PPAR γ . *Annual Review of Biochemistry* **77** 289–312. (doi:10.1146/annurev.biochem.77.061307.091829)
- Tresguerres JAF 2005 *Fisiología Humana*. Madrid: McGraw–Hill Interamericana.
- Tsuneto A, Hida A, Sera N, Imaizumi M, Ichimaru S, Nakashima E, Seto S, Maemura K & Akahoshi M 2010 Fatty liver incidence and predictive variables. *Hypertension Research* **33** 638–643. (doi:10.1038/hr.2010.45)
- Tuncman G, Hirosumi J, Solinas G, Chang L, Karin M & Hotamisligil GS 2006 Functional in vivo interactions between JNK1 and JNK2 isoforms in obesity and insulin resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103** 10741–10746. (doi:10.1073/pnas.0603509103)
- Vacca M, Allison M, Griffin JL & Vidal–Puig A 2015 Fatty acid and glucose sensors in hepatic lipid metabolism: implications in NAFLD. *Seminars in Liver Disease* **35** 250–261. (doi:10.1055/s-0035-1562945)
- Valencia AP, Schappal AE, Matthew Morris E, Thyfault JP, Lowe DA & Spangenburg EE 2016 The presence of the ovary prevents hepatic mitochondrial oxidative stress in young and aged female mice through glutathione peroxidase 1. *Experimental Gerontology* **73** 14–22. (doi:10.1016/j.exger.2015.11.011)
- Valle A, Guevara R, García–Palmer FJ, Roca P & Oliver J 2007 Sexual dimorphism in liver mitochondrial oxidative capacity is conserved under caloric restriction conditions. *American Journal of Physiology – Cell Physiology* **293** C1302–C1308. (doi:10.1152/ajpcell.00203.2007)
- Videla LA & Pettinelli P 2012 Misregulation of PPAR functioning and its pathogenic consequences associated with nonalcoholic fatty liver disease in human obesity. *PPAR Research* **2012** 1–14. (doi:10.1155/2012/107434)
- Vilatoba M, Eckstein C, Bilbao G, Frenete L, Eckhoff DE & Contreras JL 2005 17 β –Estradiol differentially activates mitogen–activated protein–kinases and improves survival following reperfusion injury of reduced–size liver in mice. *Transplantation Proceedings* **37** 399–403. (doi:10.1016/j.transproceed.2004.12.053)
- Villena JA 2015 New insights into PGC–1 coactivators: Redefining their role in the regulation of mitochondrial function and beyond. *The FEBS Journal* **282** 647–672. (doi:10.1111/febs.13175)
- Viña J, Borrás C, Gambini J, Sastre J & Pallardó F V 2005 Why females live longer than males? Importance of the upregulation of longevity–associated genes by oestrogenic compounds. *FEBS Letters* **579** 2541–2545. (doi:10.1016/j.febslet.2005.03.090)
- Viña J, Gambini J, García–García FJ & Rodríguez–Mañas L 2013 Role of oestrogens on oxidative stress and inflammation in ageing. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation* **16** 65–72. (doi:10.1515/hmbci-2013-0039)
- Viollet B, Guigas B, Leclerc J, Hébrard S, Lantier L, Mounier R, Andreelli F & Foretz M 2009 AMP–activated protein kinase in the regulation of hepatic energy metabolism: from physiology to therapeutic perspectives. *Acta Physiologica* **196** 81–98. (doi:10.1111/j.1748-1716.2009.01970.x)

- Viollet B, Guigas B, Sanz Garcia N, Leclerc J, Foretz M & Andreelli F 2012 Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clinical Science* **122** 253–270. (doi:10.1042/CS20110386)
- Völzke H, Schwarz S, Baumeister SE, Wallaschofski H, Schwahn C, Grabe HJ, Kohlmann T, John U & Dören M 2007 Menopausal status and hepatic steatosis in a general female population. *Gut* **56** 594–595. (doi:10.1136/gut.2006.115345)
- Wang H & Joseph JA 1999 Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radical Biology and Medicine* **27** 612–616. (doi:10.1016/S0891-5849(99)00107-0)
- Wang Y, Li B, Zhang W, Liu Y, Xue P, Ma J & Li Y 2013 Impaired PI3 K Akt expression in liver and skeletal muscle of ovariectomized rats. *Endocrine* **44** 659–665. (doi:10.1007/s12020-013-9894-1)
- Wang Y, Zhou Y & Graves DT 2014 FOXO transcription factors: their clinical significance and regulation. *BioMed Research International* **2014** 925350. (doi:10.1155/2014/925350)
- Wolfrum C & Stoffel M 2006 Coactivation of Foxa2 through Pgc-1beta promotes liver fatty acid oxidation and triglyceride/VLDL secretion. *Cell Metabolism* **3** 99–110. (doi:10.1016/j.cmet.2006.01.001)
- Yilmaz Y 2012 Review article: is non-alcoholic fatty liver disease a spectrum, or are steatosis and non-alcoholic steatohepatitis distinct conditions? *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* **36** 815–823. (doi:10.1111/apt.12046)
- Yki-Järvinen H 2004 Thiazolidinediones. *The New England Journal of Medicine* **351** 1106–1118. (doi:10.1056/NEJMr041001)
- Yoon M 2010 PPAR in obesity: Sex difference and estrogen involvement. *PPAR Research* **2010**. (doi:10.1155/2010/584296)
- Yu J, Marsh S, Hu J, Feng W & Wu C 2016 The pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease: interplay between diet, gut microbiota, and genetic background. *Gastroenterology Research and Practice* **2016** 2862173. (doi:10.1155/2016/2862173)
- Zhang BB, Zhou G & Li C 2009 AMPK: An emerging drug target for diabetes and the metabolic syndrome. *Cell Metabolism* **9** 407–416. (doi:10.1016/j.cmet.2009.03.012)
- Zhou M, Xu A, Tam PKH, Lam KSL, Chan L, Hoo RLC, Liu J, Chow KHM & Wang Y 2008 Mitochondrial dysfunction contributes to the increased vulnerabilities of adiponectin knockout mice to liver injury. *Hepatology* **48** 1087–1096. (doi:10.1002/hep.22444)
- Zhou M, Xu A, Lam KS, Tam PK, Che CM, Chan L, Lee IK, Wu D & Wang Y 2010 Rosiglitazone promotes fatty acyl CoA accumulation and excessive glycogen storage in livers of mice without adiponectin. *Journal of Hepatology* **53** 1108–1116. (doi:10.1016/j.jhep.2010.05.034)
- Zhu L, Martinez MN, Emfinger CH, Palmisano BT & Stafford JM 2014 Estrogen signaling prevents diet-induced hepatic insulin resistance in male mice with obesity. *American Journal of Physiology – Endocrinology And Metabolism* **306** 1188–1197. (doi:10.1152/ajpendo.00579.2013)

8. ANNEX 1. PUBLICACIÓ DERIVADA DE LA TESI DOCTORAL

17 β -estradiol improves hepatic mitochondrial biogenesis and function through PGC1B

Galmés-Pascual BM, Nadal-Casellas A, Bauza-Thorbrügge M, Sbert-Roig M, García-Palmer FJ, Proenza AM, Gianotti M, Lladó I.

Journal of Endocrinology, 2017, 232 (2): 297–308.

DOI: 10.1530/JOE-16-0350

<http://joe.endocrinology-journals.org/content/232/2/297.long>

9. ANNEX 2. PUBLICACIONS COMPLEMENTÀRIES

Antioxidant peroxiredoxin 3 expression is regulated by 17beta-estradiol in rat white adipose tissue

Bauzá-Thorbrügge M, Galmés-Pascual BM, Sbert-Roig M, García-Palmer FJ, Gianotti M, Proenza AM, Lladó I.

Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, en curs de publicació.

DOI: 10.1016/j.jsbmb.2017.05.008

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096007601730132>

[2](#)

GPER mediates the effects of 17 β -estradiol in cardiac mitochondrial biogenesis and function

Sbert-Roig M, Bauzá-Thorbrügge M, Galmés-Pascual BM, Capllonch-Amer G, García-Palmer FJ, Lladó I, Proenza AM, Gianotti M.

Molecular and Cellular Endocrinology, 2016, 420: 116–24.

DOI: 10.1016/j.mce.2015

[https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030372071530151](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0303720715301519)

[9](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0303720715301519)

Estradiol stimulates mitochondrial biogenesis and adiponectin synthesis in skeletal muscle

Capllonch–Amer G, Sbert–Roig M, Galmés–Pascual BM, Proenza AM, Lladó I, Gianotti M, García–Palmer FJ.

Journal of Endocrinology, 2014, 221 (3): 391–403.

DOI: 10.1530/JOE-14-0008

<http://joe.endocrinology-journals.org/content/221/3/391.full>

Allò que per a l'eruga és la fi del món, per a
la resta del món s'anomena papallona

Lao Tsé

