



**Universitat**  
de les Illes Balears

**TESI DOCTORAL**

**2021**

**EFFECTES MODULADORS DE LES HORMONES SEXUALS FEMENINES  
SOBRE EL SISTEMA CARDIOVASCULAR EN LA DIABESITAT**

**Agustín González Vicens**





**Universitat**  
de les Illes Balears

**TESI DOCTORAL**

**2021**

**EFFECTES MODULADORS DE LES HORMONES SEXUALS FEMENINES  
SOBRE EL SISTEMA CARDIOVASCULAR EN LA DIABESITAT**

**Agustín González Vicens**

**Programa de Doctorat en Nutrició i Ciències dels Aliments**

**Directora: Dra. Ana María Proenza Arenas**

**Directora i tutora: Dra. Magdalena Gianotti Bauzá**

**Doctor per la Universitat de les Illes Balears**



Amb el vistiplau de les directores:

**Dra. Magdalena Gianotti Bauzà**

Catedràtica d'Universitat

**Dra. Ana María Proenza Arenas**

Catedràtica d'Universitat

Àrea de Bioquímica i Biologia Molecular

Dept. Biologia Fonamental i Ciències de la Salut

L'interessat

**Agustín González Vicens**



**Universitat de les  
Illes Balears**

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

DECLARO:

Que la tesi doctoral que porta per títol *Efectes moduladors de les hormones sexuals femenines sobre el sistema cardiovascular en la diabetat*, presentada pel senyor Agustín González Vicens per a l'obtenció del títol de doctor, ha estat dirigida sota la meva supervisió i que compleix amb els requisits necessaris per optar al títol de Doctor.

I perquè quedi constància d'això signo aquest document.





**Universitat de les  
Illes Balears**

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

DECLARO:

Que la tesi doctoral que porta per títol *Efectes moduladors de les hormones sexuals femenines sobre el sistema cardiovascular en la diabetat* , presentada pel senyor Agustín González Vicens per a l'obtenció del títol de doctor, ha estat dirigida sota la meva supervisió i que compleix amb els requisits necessaris per optar al títol de Doctor.

I perquè quedi constància d'això signo aquest document.





*Gràcies a totes les persones que han  
contribuït al desenvolupament  
d'aquest projecte i que m'han recolzat  
en els moments més difícils*



## ÍTACA

Quan surts per fer el viatge cap a Ítaca,  
has de pregar que el camí sigui llarg,  
ple d'aventures, ple de coneixences.

Els Lestrígons i els Cíclops,  
l'aïrat Posidó, no te n'esfereixis:  
són coses que en el teu camí no trobaràs,  
no, mai, si el pensament se't manté alt,  
si una emoció escollida et toca l'esperit i el cos alhora.

Els Lestrígons i els Cíclops,  
el feroç Posidó, mai no serà que els topis  
si no els portes amb tu dins la teva ànima,  
si no és la teva ànima que els dreça davant teu.

Has de pregar que el camí sigui llarg.  
Que siguin moltes les matinades d'estiu  
que, amb quina delectança, amb quina joia!  
entraràs en un port que els teus ulls ignoraven;  
que et puguis aturar en mercats fenicis  
i comprar-hi les bones coses que s'hi exhibeixen,  
corals i nacres, marbres i banussos  
i delicats perfums de tota mena:  
tanta abundor com puguis de perfums delicats;  
que vagis a ciutats d'Egipte, a moltes,  
per aprendre i aprendre dels que saben.

Sempre tingues al cor la idea d'Ítaca.  
Has d'arribar-hi, és el teu destí.  
Però no forcis gens la travessia.  
És preferible que duri molts anys  
i que ja siguis vell quan fondegis a l'illa,  
ric de tot el que hauràs guanyat fent el camí,  
sense esperar que t'hagi de dar les riqueses Ítaca.  
Ítaca t'ha donat el bell viatge.  
Sense ella no hauries pas sortit cap a fer-lo.

Res més no té que et pugui ja donar.  
I si la trobes pobra, no és que Ítaca t'hagi enganyat.  
Savi com bé t'has fet, amb tanta experiència,  
ja hauràs pogut comprendre què volen dir les Ítaques.

*Constantinos Kavafis*



La present tesi doctoral s'ha realitzat en el Grup de Metabolisme Energètic i Nutrició del Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut de la Universitat de les Illes Balears. Aquest grup d'investigació és membre de l'Institut Universitari d'Investigació en Ciències de la Salut (IUNiCS) de la Universitat de les Illes Balears, del Centre d'Investigacions Biomèdiques en Xarxa de Fisiopatologia de l'Obesitat i la Nutrició (CIBERobn) de l'Institut Carlos III (CB06/03/0043), i de l'Institut d'Investigació Sanitària de les Illes Balears (IdISBa). Aquest treball ha estat possible gràcies als projectes d'investigació finançats per la Direcció General d'Investigació i Gestió del Pla Nacional de I+D+I (SAF2016-80384R) del Govern Espanyol, i per ajudes de la Comunitat Autònoma de les Illes Balears cofinançades amb els fons FEDER. Durant un període de 15 mesos el doctorant va disposar d'un contracte com a tècnic de laboratori per mitjà del Programa SOIB JOVE - Qualificats Sector Públic i que ha estat finançat pel SOIB amb el cofinançament del Fons Social Europeu (FSE) i la Garantia Juvenil.



**Universitat**  
de les Illes Balears

G CONSELLERIA  
O SALUT  
I FUNDACIÓ  
B INSTITUT  
INVESTIGACIÓ  
SANITÀRIA  
ILLES BALEARNS



Institut  
d'Investigació Sanitària  
Illes Balears

**iUNiCS**  
Institut Universitari d'Investigació en Ciències de la Salut

**soib**  
formació  
i ocupació



ESTRATEGIA DE  
EMPENDIMIENTO Y  
EMPLEO JOVEN  
**garantía juvenil**



Fondo Social Europeo  
Europa invierte en tu futuro



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



# Índex

<b>ABREVIATURES</b> .....	<b>20</b>
<b>Resum / Resumen / Abstract</b> .....	<b>23</b>
<b>1. Introducció</b> .....	<b>30</b>
1.1 <i>Les malalties cardiovasculars. Factors de risc</i> .....	31
1.2 <i>Cardiomiopatia diabètica</i> .....	34
1.2.1 <i>Metabolisme energètic cardíac i resistència a la insulina</i> .....	36
1.2.2 <i>Disfunció mitocondrial i estrès oxidatiu</i> .....	37
1.2.3 <i>Alteracions estructurals de la cardiomiopatia diabètica</i> .....	38
1.2.4 <i>Inflamació del teixit cardíac</i> .....	39
1.3 <i>Disfunció endotelial</i> .....	39
1.4 <i>Senyalització estrogènica al sistema cardiovascular</i> .....	41
<b>2. Objectius i plantejament experimental</b> .....	<b>45</b>
<b>3. Materials i mètodes</b> .....	<b>51</b>
3.1 <i>Estudis in vivo amb rates ZDF</i> .....	52
3.1.1 <i>Model animal Zucker Diabetic Fatty rats (ZDF)</i> .....	52
3.1.2 <i>Manteniment de la colònia i fenotipat</i> .....	53
3.1.3 <i>Procediments i tractaments experimentals</i> .....	53
3.1.4 <i>Extracció de sang venosa i determinació de paràmetres circulants</i> .....	56
3.1.5 <i>Determinació de la tolerància oral a la glucosa (OGTT) i la tolerància a la insulina (ITT)</i> .....	57
3.1.6 <i>Determinació del cicle estral</i> .....	58
3.1.7 <i>Eutanàsia i extracció de teixits</i> .....	59
3.1.8 <i>Consum d'oxigen en mitocondris aïllats de teixit cardíac</i> .....	60
3.2 <i>Estudis in vitro amb cardiomioblasts H9c2</i> .....	62
3.2.1 <i>Línia cel·lular H9c2</i> .....	62
3.2.2 <i>Manteniment i subcultiu de les H9c2</i> .....	62
3.2.3 <i>Congelació i descongelació</i> .....	63
3.2.4 <i>Tractaments</i> .....	64
3.2.5 <i>Determinació de la viabilitat</i> .....	65
3.2.6 <i>Determinació de la quantitat d'ATP</i> .....	66
3.2.7 <i>Determinació de la contingut mitocondrial (MTG)</i> .....	66
3.2.8 <i>Determinació de la producció d'ió superòxid</i> .....	67
3.3 <i>Estudis in vitro amb cèl·lules endotelials HUVEC</i> .....	68
3.3.1 <i>Línia cel·lular HUVEC</i> .....	68
3.3.2 <i>Manteniment i subcultiu de les HUVEC</i> .....	68



3.3.3 Congelació i descongelació.....	68
3.3.4 Tractaments .....	69
<b>3.4 Metodologia general .....</b>	<b>70</b>
3.4.1 Obtenció de proteïna del cor .....	70
3.4.2 Obtenció de proteïna de cèl·lules H9c2 .....	70
3.4.3 Quantificació de proteïna.....	71
3.4.4 Determinació semi-quantitativa de proteïnes específiques per Western blot. .	71
3.4.5 Activitats enzimàtiques .....	74
3.4.6 Determinació semi-quantitativa de l'expressió gènica .....	78
<b>3.5 Anàlisi estadística .....</b>	<b>83</b>
<b>3.6 Protocols .....</b>	<b>84</b>
<b>4. Resultats i discussió .....</b>	<b>97</b>
<i>4.1 Efectes de les hormones sexuals femenines en l'homeòstasi cardiovascular en un model murí de diabetat.....</i>	<i>98</i>
4.1.1 Resultats.....	98
4.1.2 Discussió.....	116
<i>4.2 Efectes del 17<math>\beta</math>-estradiol en un model in vitro de lipotoxicitat cardíaca induïda amb palmitat .....</i>	<i>130</i>
4.2.1 Resultats.....	130
4.2.2 Discussió.....	136
<i>4.3 Efectes de les hormones sexuals femenines en el desenvolupament de la disfunció endotelial en un model murí de diabetat. ....</i>	<i>141</i>
4.3.1 Resultats.....	141
4.3.2 Discussió.....	146
<i>4.4 Efectes del 17<math>\beta</math>-estradiol a cèl·lules endotelials en condicions de glucolipotoxicitat .....</i>	<i>152</i>
4.4.1 Resultats.....	152
4.4.2 Discussió.....	158
<b>5. Recapitulació .....</b>	<b>165</b>
<b>6. Conclusions.....</b>	<b>173</b>
<b>7. Referències bibliogràfiques.....</b>	<b>176</b>





## ABREVIATURES

**AdipoR1, AdipoR2:** receptors 1 i 2 de l'adiponectina  
**AG:** àcids grassos  
**AGE:** productes de glicació avançats  
**AKT:** proteïna cinasa B  
**AMPK:** cinasa activada per AMP  
**APPL1:** proteïna adaptadora, fosfotirosina que interactua amb el domini PH i la cremallera de leucina 1  
**BSA:** albúmina sèrica bovina  
**CMD:** cardiomiopatia diabètica  
**CD36:** clúster de diferenciació 36  
**COX:** citocrom c oxidasa  
**COX I, COX IV:** subunitats I i IV de la citocrom c oxidasa  
**CsA:** ciclosporina A  
**DAG:** diacilglicerol  
**DPBS:** solució salina de fostat tamponada de Dulbecco  
**DMEM:** medi Eagle modificat per Dulbecco  
**DMSO:** dimetilsulfòxid  
**DM2:** diabetis mellitus tipus 2  
**E<sub>2</sub>:** 17β-estradiol  
**EDTA:** àcid etilendiaminotetraacètic  
**eNOS:** sintasa d'òxid nítric endotelial  
**ERα, ERβ:** receptors d'estrògens α i β  
**ERK:** cinasa activada per senyals extracel·lulars  
**ET-1:** endotelina 1  
**FBS:** sèrum fetal boví  
**FN1:** fibronectina 1  
**GLUT4:** transportadors de glucosa de tipus 1 i 4  
**GPER:** receptor d'estrògens associat a proteïnes G  
**HbA1c:** hemoglobina glucosilada  
**HIF-1α:** factor induït per hipòxia 1α  
**HOMA-IR:** model homeostàtic d'estimació de la resistència a la insulina  
**HVE:** hipertròfia ventricular esquerra  
**QUICKI:** índex quantitatiu de la sensibilitat a la insulina  
**HUVECs:** cèl·lules endotelials de vena de cordó umbilical humà  
**HVE:** hipertròfia ventricular esquerra  
**ICAM:** molècula d'adhesió intercel·lular  
**IL6:** interleucina 6

**INE:** institut nacional d'estadística  
**iNOS:** sintasa d'òxid nítric induïble  
**ITT:** test de tolerància a la insulina  
**MAPK:** cinases activades per mitògens  
**MCP1:** proteïna quimiotàctica de monòcits 1  
**MCV:** malaltia cardiovascular  
**MEC:** matriu extracel·lular  
**mPTP:** porus de transició de permeabilitat mitocondrial  
**NEFA:** àcids grassos no esterificats  
**NF-κB:** factor nuclear κB  
**NO:** òxid nítric  
**OGTT:** test tolerància oral a la glucosa  
**OMS:** organització mundial de la salut  
**OXPHOS:** sistema de fosforilació oxidativa  
**PA:** palmitat  
**PAI-1:** inhibidor de l'activació del plasminogen 1  
**PBS:** tampó fosfat salí  
**PBS-T:** PBS amb Tween 20  
**PGC-1α, PGC-1β:** coactivadors 1α i 1β del receptor activat per proliferadors peroxisomals γ  
**PI3K:** cinasa del 3-fosfatidilinositol  
**PPARα, PPARβ/δ, PPARγ:** receptors activats per proliferadors peroxisomals α, β/δ i γ  
**RIPA:** solució per a lisis cel·lular  
**ROS:** espècies reactives de l'oxigen  
**MnSOD:** superòxid dismutasa amb Manganès  
**SMet:** síndrome metabòlica  
**TEMED:** tetrametilendiamina  
**TFAM:** factor de transcripció mitocondrial A  
**TG:** triglicèrids  
**TGFβ1:** factor de creixement transformant β1  
**TNF-α:** factor de necrosi tumoral α  
**TRIS:** trisaminometà  
**u.a.:** unitats arbitràries  
**UCP2, UCP3:** proteïnes desacobllants 2 i 3  
**VCAM:** molècula d'adhesió vascular  
**ZDF:** rates diabètiques i obesas de la soca Zucker  
**4-HNE:** 4-hidroxinonenal



## Resum

### Efectes moduladors de les hormones sexuals femenines sobre el sistema cardiovascular en la diabetis



*Tesi doctoral, Agustín González Vicens, Programa de Doctorat en Nutrició i Ciències dels Aliments. Grup de Metabolisme Energètic i Nutrició, Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut.*

**Universitat**  
de les Illes Balears

El paper protector dels estrògens front l'obesitat, la diabetis i les seves complicacions a nivell cardiovascular és objecte d'estudi. Alguns estudis han posat de manifest que les rates femella presenten una major capacitat de resistència al desenvolupament de diabetis i obesitat induïda per una dieta hiperlipídica que els mascles i aquest fet s'ha atribuït a les hormones sexuals femenines. També són nombroses les evidències, amb models que simulen la menopausa en rates mitjançant una ovariectomia, que mostren l'efecte protector dels estrògens a diferents òrgans. Igualment, altres estudis en cor, aorta o en cèl·lules provinents d'aquests òrgans han demostrat els efectes directes dels estrògens sobre la funció mitocondrial, així com el seu paper protector front l'estrès oxidatiu o la disfunció endotelial. Ara bé, recentment diversos estudis en humans han descrit que els possibles efectes cardioprotectors dels estrògens podrien veure's disminuïts per la diabetis i l'obesitat (diabetis) i que, en aquestes condicions, les dones tenen un risc superior de sofrir un accident cardiovascular respecte als homes en les mateixes circumstàncies.

Tenint en compte aquests antecedents, s'ha plantejat com objectiu principal d'aquesta tesi estudiar els efectes de les hormones sexuals femenines i, en concret, els de l'estradiol, en el sistema cardiovascular en condicions de diabetis, per tal d'aportar evidències sobre aquesta possible dualitat del paper dels estrògens. Per assolir aquest objectiu s'ha utilitzat un model de rata de la soca ZDF que, per una mutació al receptor de la leptina, desenvolupa diabetis en resposta a una dieta hiperlipídica. Per anul·lar la producció endògena

d'estrògens es va realitzar una ovariectomia i un grup es va tractar amb estradiol per determinar els efectes d'aquesta hormona en concret. Es va monitoritzar la glucèmia i el pes corporal setmanalment i en el moment del sacrifici es va extreure el cor i l'aorta per a determinar marcadors de funció mitocondrial, disfunció endotelial, fibrosi, inflamació i dany oxidatiu. Els experiments *in vivo* es varen complementar amb experiments *in vitro* amb cardiomioblasts H9c2 i cèl·lules endotelials HUVEC tractades amb estradiol en condicions que simulen la glucolipotoxicitat característica de la diabetat, per avaluar els efectes d'aquesta hormona.

Els resultats obtinguts indiquen que l'ovariectomia atenua la condició patològica en rates diabètiques ja que promou una disminució de marcadors relacionats amb el risc cardiovascular com la hiperglucèmia, la resistència a la insulina, la fibrosi cardíaca i la disfunció endotelial principalment. També s'ha observat que el tractament amb estradiol reverteix els efectes atenuadors de l'ovariectomia, el que posa de manifest la idea d'un efecte deleteri dels estrògens en la diabetat. Per altra banda, els resultats obtinguts a cèl·lules endotelials, indiquen que l'estradiol potencia l'efecte de la glucolipotoxicitat incrementant l'expressió de paràmetres de disfunció endotelial, el que corrobora el perfil observat a les aortes de les rates tractades amb estradiol.



## Resumen

### **Efectos moduladores de las hormonas sexuales femeninas sobre el sistema cardiovascular en la diabetes**



*Tesis doctoral, Agustín González Vicens, Programa de Doctorado en Nutrición y Ciencias de los Alimentos. Grupo de Metabolismo Energético y Nutrición, Departamento de Biología Fundamental y Ciencias de la Salud.*

**Universitat**  
de les Illes Balears

El papel protector de los estrógenos contra la obesidad, la diabetes y sus complicaciones a nivel cardiovascular es objeto de estudio. Algunos estudios han demostrado que las ratas hembra tienen una mayor capacidad de resistencia al desarrollo de la diabetes y la obesidad inducida por una dieta hiperlipídica que las ratas macho y esto se ha atribuido a las hormonas sexuales femeninas. También hay numerosas pruebas, con modelos simulados de menopausia en ratas, utilizando una ovariectomía, que muestran el efecto protector de los estrógenos en diferentes órganos. Asimismo, otros estudios en el corazón, en la aorta o en células de estos órganos han demostrado los efectos directos de los estrógenos sobre la función mitocondrial, así como su papel protector contra el estrés oxidativo o la disfunción endotelial. Sin embargo, recientemente varios estudios en humanos han descrito que los posibles efectos cardioprotectores de los estrógenos podrían verse disminuidos por la diabetes y la obesidad (diabetes) ya que, en estas condiciones, las mujeres tienen un riesgo mayor de sufrir un accidente cardiovascular en comparación a hombres en las mismas circunstancias. Teniendo en cuenta estos antecedentes, se ha propuesto como objetivo principal de esta tesis estudiar los efectos de las hormonas sexuales femeninas y, en concreto, los del estradiol, en el sistema cardiovascular en condiciones de diabetes, con el fin de aportar pruebas sobre esta posible dualidad del papel de los estrógenos. Para lograr este objetivo, se ha utilizado un modelo de rata de la cepa ZDF que, por una mutación en el receptor de leptina, desarrolla diabetes en respuesta a una dieta hiperlipídica. Para cancelar la producción endógena de estrógenos se realizó una ovariectomía y un grupo fue

tratado con estradiol para determinar los efectos de esta hormona en particular. La glucemia y el peso corporal fueron monitoreados semanalmente y en el momento del sacrificio se extrajeron el corazón y la aorta para determinar marcadores de la función mitocondrial, disfunción endotelial, fibrosis, inflamación y daño oxidativo. Los experimentos *in vivo* se complementaron con experimentos *in vitro* con cardiomioblastos H9c2 y células endoteliales HUVEC tratados con estradiol en condiciones que simulan la glucolipototoxicidad característica de la diabetes, para evaluar los efectos de esta hormona.

Los resultados obtenidos indican que la ovariectomía atenúa la condición patológica en ratas diabéticas, ya que promueve una disminución en los marcadores relacionados con el riesgo cardiovascular como la hiperglucemia, la resistencia a la insulina, la fibrosis cardíaca y la disfunción endotelial principalmente. También se ha observado que el tratamiento con estradiol revierte los efectos atenuantes de la ovariectomía, lo que pone en relieve la idea de un efecto deletéreo de los estrógenos en la diabetes. Por otro lado, los resultados obtenidos en las células endoteliales indican que el estradiol potencia el efecto de la glucolipototoxicidad aumentando la expresión de los parámetros de disfunción endotelial, lo que corrobora el perfil observado en aortas de las ratas ZDF tratadas con estradiol.

## Abstract

### Modulating effects of female sex hormones on the cardiovascular system in diabetes



*Doctoral thesis, Agustín González Vicens, Doctoral Program of Nutrition and Food Sciences. Energy Metabolism and Nutrition Group, Department of Fundamental Biology and Health Sciences*

**Universitat**  
de les Illes Balears

The protective role of estrogens against obesity, diabetes and their complications at cardiovascular level is a subject of study. Some studies have shown that female rats have a greater capacity of resistance to the development of diabetes and obesity induced by a high-fat diet than their female counterparts and this has been attributed to female sex hormones. There is also evidence, with models simulating menopause in rats using an ovariectomy, showing the protective role of estrogens on different organs. Likewise, other studies in the heart, aorta or in cells cultures from these organs have shown the direct effects of estrogens on mitochondrial function, as well as their protective role against oxidative stress or endothelial dysfunction. However, recently several studies in humans have described that the possible cardioprotective effects of the estrogens could be abrogated by diabetes and obesity (diabesity) because, in these conditions, women have a higher risk to suffer a cardiovascular event than men in the same circumstances.

Taking these antecedents into account, it has been proposed as the main objective of this thesis to study the effects of female sex hormones, and specifically estradiol, on the cardiovascular system under diabesity conditions in order to provide evidence on this possible dual role of estrogens. To achieve this goal, a rat model of the ZDF strain has been used, which, by a mutation in the leptin receptor, develops diabesity in response to high-fat diet. To abolish the endogenous production of estrogen rats were ovariectomized and a group was treated with estradiol to determine the effects of this particular hormone.

Glycemia and body weight were monitored weekly and at the time of sacrifice heart and aorta were extracted to determine markers of mitochondrial function, endothelial dysfunction, fibrosis, inflammation and oxidative damage. *In vivo* experiments were complemented by *in vitro* treatment with estradiol of H9c2 cardiomyoblasts and HUVEC endothelial cells under conditions of glucolipotoxicity that mimicked diabetes in order to assess the effects of estradiol in these conditions.

The results obtained indicate that ovariectomy attenuates the pathological condition in diabetic rats as it promotes a decrease in markers related to cardiovascular risk such as hyperglycemia, insulin resistance, heart fibrosis and endothelial dysfunction. It has also been observed that estradiol treatment reverses the mitigating effects of ovariectomy, which highlights the idea of a deleterious effect of estrogens on diabetes. On the other hand, the results obtained in endothelial cells indicate that estradiol enhances the effect of glucolipotoxicity by increasing the expression of endothelial dysfunction parameters, which corroborates the profile observed in aorta of those rats treated with estradiol.



## **1. Introducció**

## 1.1 Les malalties cardiovasculars. Factors de risc

Les malalties cardiovasculars (MCV) són un conjunt d'afeccions del cor i els vasos sanguinis. Segons dades de l'Organització Mundial de la Salut (OMS) [1], el 2019 les MCV van ser la primera causa de mort tan en homes com en dones amb un total de 15,2 milions de morts (sumant les morts per malaltia coronària i per accident cerebrovascular). A Espanya, les dades de l'últim informe de l'*Instituto Nacional de Estadística (INE)*, resumides en la figura 1, situen a les MCV en primera posició de les causes de defunció el 2017, sent la primera causa de mort del sexe femení i la segona del sexe masculí, després dels tumors. Cal destacar, que entre les morts per MCV es varen observar diferències entre sexes. Així doncs, la isquèmia cardíaca va afectar majoritàriament a homes mentre que en les dones ho van fer les malalties cerebrovasculars i la insuficiència cardíaca.

	Total	Hombres	Mujeres
Total enfermedades	424.523	214.236	210.287
Enfermedades isquémicas del corazón	32.325	19.132	13.193
Enfermedades cerebrovasculares	26.937	11.555	15.382
Cáncer de bronquios y pulmón	22.089	17.241	4.848
Demencia	21.001	6.977	14.024
Insuficiencia cardíaca	19.165	6.964	12.201
Enf. crónicas de las vías respiratorias inferiores (ECVRI)	15.486	11.233	4.253
Enfermedad de Alzheimer	15.202	4.335	10.867
Enfermedad hipertensiva	12.560	3.986	8.574
Cáncer de colon	11.406	6.586	4.820
Neumonía	10.222	5.279	4.943
Diabetes mellitus	9.773	4.293	5.480
Cáncer de páncreas	6.868	3.590	3.278
Insuficiencia renal	6.618	3.043	3.575
Cáncer de mama	6.573	84	6.489
Cáncer de próstata	5.938	5.938	0

<sup>1</sup> Causas con peso relativo superior al 1,4%

**Figura 1. Defuncions segons la causa de mort més freqüent. Espanya 2017.**

Font: *Defunciones según las causas de muerte por grupos de enfermedades (2018)* [2].

Les MCV es poden classificar en funció de l'etiologia, de l'òrgan o teixit que afecta i també del desenvolupament propi de la malaltia. Des del punt de vista epidemiològic les MCV amb més prevalença són la malaltia coronària i els accidents cerebrovasculars, que ahora engloben diferents manifestacions

clíniques. En les últimes dècades però, degut a l'augment de la *diabetis mellitus* tipus 2 (DM2), ha agafat importància la cardiomiopatia diabètica (CMD) com entitat clínica pròpia, encara que no sol ser un diagnòstic clínic ja que el que es diagnostica són les seves manifestacions clíniques com la insuficiència cardíaca. La CMD es troba classificada dins el grup de les cardiomiopaties perquè les principals alteracions es produeixen en els cardiomiòcits, i a més, és una patologia independent de la presència de malaltia coronària.

### **Factors de risc de les malalties cardiovasculars**

Històricament les MCV s'han associat estretament a la hiperlipèmia i al desenvolupament de la placa d'ateroma però, amb l'augment de la prevalença de la diabetis i la millora que han suposat els tractaments hipolipemians, el focus d'atenció actualment està virant cap a un nou factor de risc, la hiperglucèmia. Sigui com sigui, la diabetis i l'obesitat són dues de les afeccions que conformen la Síndrome Metabòlica (SMet), la qual es considerada un dels factors de risc més importants pel desenvolupament de MCV. En una revisió sistemàtica recent [3] de la literatura científica entre els anys 2007 i 2017, sobre la prevalença de MCV en DM2, els autors varen concloure que les MCV varen ser la causa de mort de gairebé el 50% dels subjectes analitzats (n= 4 549 481). Tenint en compte les dades de la International Diabetes Federation [4], el nombre de persones que pateixen DM2 ha passat de 108 milions el 1980 a 422 milions el 2014 i es preveu arribar a 642 milions el 2040. Així doncs, ens trobem davant un futur repte de salut global on la diabetis i les malalties cardiovasculars seran les protagonistes.

Les MCV es defineixen en la majoria dels casos com malalties cròniques i el seu desenvolupament depèn fortament de factors modificables. Segons estimacions de la OMS al voltant del 80% de les morts prematures per MCV podrien ser evitades amb un correcta prevenció dels factors de risc modificables com la hiperglucèmia, la hipercolesterolèmia, el tabaquisme o la hipertensió arterial.



Alguns dels factors de risc esmenats anteriorment, com la hiperglucèmia o la hipercolesterolèmia, estan directament implicats en la formació de la placa d'ateroma a les artèries que, amb el temps, porten a la insuficiència cardíaca per isquèmia coronària o bé participen en la formació d'èmbols que poden acabar en un infart de miocardi o un ictus isquèmic. Altres, com la hipertensió arterial augmenten la demanda energètica del múscul cardíac i potencien el desenvolupament de la insuficiència cardíaca i, en alguns casos, un sol factor de risc, com la hiperglucèmia, és la causa principal d'una malaltia com la CMD. Els factors de risc modificables són els mateixos per a homes i dones, però s'ha demostrat en diversos estudis que alguns factors com la *diabetis mellitus* confereixen el doble de risc de morir per MCV en dones que en homes [5]–[8]. Entre els factors de risc cardiovascular no modificables trobam l'edat, factors genètics, la raça i el sexe. Tradicionalment s'ha associat, erròniament, una menor prevalença de MCV en dones. Les causes d'aquesta concepció són vàries però destaquen el fet de que les dones presenten una simptomatologia diferent a la dels homes en algunes patologies cardíques com l'angina i el fet que les dones, generalment, presenten les primeres manifestacions de MCV uns 10 anys més tard que els homes [9]. Aquest segon fet s'ha associat a l'efecte protector de les hormones sexuals femenines que tindrien un cert paper cardioprotector i que es veuria disminuït amb la menopausa i la disminució dels nivells circulants d'hormones sexuals femenines, especialment l'estradiol (E2). També s'ha de tenir en compte que tan en recerca clínica com en assajos clínics, la presència d'homes entre els subjectes participants ha estat superior [10] i per tant hi ha hagut un biaix tant en l'estudi de la fisiopatologia de les MCV, i els seus símptomes, com també en el seu tractament en les dones. A partir dels anys 60 del segle XX, amb la introducció de nous fàrmacs i estratègies de salut pública, es va millorar el tractament de les MCV i, conseqüentment, es va reduir notablement la mortalitat global, no obstant, la reducció de mortalitat ha estat superior en homes que en dones [11]. Aquesta diferència podria ser deguda a un menor ús de teràpies

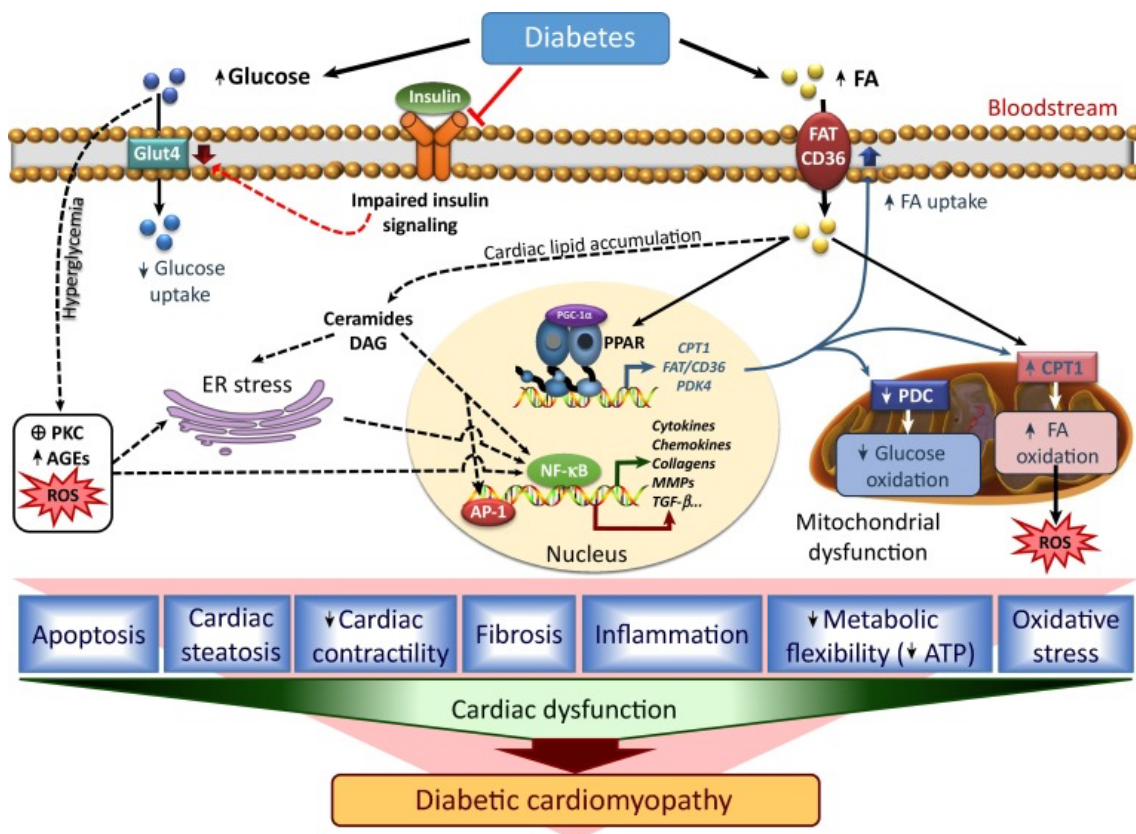
preventives en les dones que anirien destinades a disminuir els factors de risc com la hipercolesterolèmia, l'obesitat i la hipertensió [12], [13].

Tenint en compte que la prevalença de diabetis està augmentant globalment no seria estrany veure un impacte major sobre la mortalitat cardiovascular. De fet, segons les darreres dades de l'INE, al 2017 (figura 1) les morts per MCV comparades amb l'any anterior varen ser un 2,8% superiors en dones front un 1,6% en homes [2]. Així mateix, a la mateixa figura es pot observar que al 2017 les morts per diabetis varen ser superiors en dones que en homes, situació que es contraposa a la concepció clàssica de que les dones estan protegides enfront la diabetis. Per tals motius, a pesar de l'efecte cardioprotector documentat dels estrògens en condicions metabòliques sanes [14],[15], es posa en entredit l'efecte cardioprotector dels estrògens durant la diabetis. Per això, és imprescindible incorporar la variable hormonal en els estudis en condicions com la DM2 o l'obesitat per així poder donar una resposta terapèutica adient en cada situació.

## **1.2 Cardiomiopatia diabètica**

La CMD és una afecció del teixit muscular cardíac definida per l'existència d'una estructura del miocardi alterada i disfunció ventricular en absència de malaltia coronària, hipertensió o malalties valvulars en pacients amb diabetis [16]. En l'etiologia de la CMD destaquen la hiperglucèmia, l'estrès oxidatiu i la disfunció mitocondrial. Durant els primers estadis, la CMD es presenta com una alteració subclínica caracteritzada per canvis estructurals com hipertrofia ventricular i fibrosis, així com també, alteracions a la senyalització cel·lular. A conseqüència de l'augment de rigidesa del miocardi s'acaba produint disfunció cardíaca subclínica que acaba derivant a una insuficiència cardíaca severa. De fet, alguns estudis recents [17] han posat de manifest que existeix una relació lineal entre la glucèmia i la mortalitat cardiovascular.

A continuació es detallen les vies metabòliques implicades en les principals alteracions presents en la CMD (figura 2). Com elements iniciadors es destaca la pèrdua de sensibilitat a la insulina i la reducció de la captació i oxidació de glucosa que va acompanyada d'un increment en la captació de lípids. L'alteració en la captació dels substrats energètics suposa una acumulació intracardíaca de lípids una major dependència de l'oxidació d'àcids grassos, el que condueix a la formació de metabòlits tòxics i a la disfunció mitocondrial. En última instància, la desregulació dels fluxos de calci i l'estrès oxidatiu, juntament amb les modificacions estructurals de la matriu extracel·lular, contribueixen al desenvolupament de la hipertrofia i a la disfunció cardíaca.



**Figura 2. Principals vies metabòliques implicades en la cardiomiopatia diabètica.**

Font: *Emerging Actors in Diabetic Cardiomyopathy: Heartbreaker Biomarkers or Therapeutic Targets?* (2018) [18]

### 1.2.1 Metabolisme energètic cardíac i resistència a la insulina

En condicions fisiològiques, el múscul cardíac es capaç d'utilitzar diversos substrats tals com àcids grassos (AG), glucosa, cossos cetònics, lactat i alguns aminoàcids, com a combustibles per a produir ATP. La major part de l'energia utilitzada pel cor, fins a un 90-95%, prové de la fosforilació oxidativa produïda als mitocondris, que ocupen aproximadament un 30% del volum cel·lular. El 5-10% restant prové de l'oxidació de la glucosa i el lactat a través del cicle de Krebs [19], [20]. La captació d'AG al cor es produeix majoritàriament a través de la translocació del transportador CD36 a la cara externa de la membrana cel·lular. En condicions d'hiperlipèmia l'expressió de CD36 es troba estimulada el que contribueix a una major translocació i captació d'AG [21], [22].

Per altra banda, la captació de la glucosa al cor està lligada majoritàriament al receptor GLUT4 i aquest depèn de l'estimulació de la insulina, via PI3K/AKT, per a translocar-se a la membrana cel·lular i realitzar la seva funció. En la CMD, la captació de glucosa es troba alterada degut a la dessensibilització de la via de la insulina el que incrementa la captació i oxidació mitocondrial d'AG per suplir la falta energètica causada per la menor oxidació de glucosa. Com a resultat d'aquest canvi de substrat energètic es produeixen més metabòlits provinents de l'oxidació d'AG com el diacilglicerol (DAG) i les ceramides que contribueixen a l'anomenada lipotoxicitat cardíaca. Un dels efectes de la lipotoxicitat, i que a més expliquen la dessensibilització de la via de la insulina, és a través de l'activació de proteïna-cinases (PKC) per part de les ceramides i el DAG que produeix el bloqueig de la senyalització de l'eix PI3K/AKT i la translocació de GLUT4 [23]–[25]. A la CMD, la dificultat per captar glucosa accentua la dependència cardíaca d'AG que, alhora, dificulta encara més la captació de glucosa i s'acaba produint un cicle viciós que altera el metabolisme cardíac. Alguns estudis han posat de manifest que l'activació de l'AMPK cardíaca millora la captació de glucosa i la funció

cardíaca [26] i podria ser una bona diana terapèutica per a revertir els efectes de la cardiomiopatia diabètica.

### **1.2.2 Disfunció mitocondrial i estrès oxidatiu**

La disfunció mitocondrial juga un paper molt important en el desenvolupament de diverses malalties, com és el cas de la CMD. Degut a l'elevada demanda energètica del cor i tenint en compte que el mitocondri satisfà gairebé tota aquesta demanda a través de l'oxidació dels AG, es sap que una disfunció en aquest orgànul té conseqüències negatives per al metabolisme cardíac. Com ja s'ha comentat anteriorment, degut a la disminució de l'ús de la glucosa en el cor diabètic, s'estimula l'oxidació d'AG en el mitocondri el que provoca una major producció d'espècies reactives d'oxigen (ROS) a través dels complexos I i III de la cadena de transport d'electrons. D'entre les principals ROS destaquen l'ió superòxid, el peròxid d'hidrogen ( $H_2O_2$ ) i el radical hidroxil i degut a les seves característiques químiques tenen una alta capacitat per reaccionar amb biomolècules com l'ADN, les proteïnes i els lípids produint la seva destrucció o mal funcionament. Per altra banda, en certes situacions també s'ha vist que algunes ROS tenen capacitat per estimular o inhibir vies de senyalització [27]. En condicions fisiològiques, la formació de ROS és un procés natural que pot ser degudament contrarestat pels sistemes antioxidants de la cèl·lula cardíaca. No obstant això, la capacitat antioxidant és limitada i quan aquesta es sobrepassada es crea un entorn d'estrès oxidatiu.

Així doncs, a conseqüència de la hiperproducció de ROS en el cor diabètic, es produeix un entorn estressant que condueix a l'increment de la via del poliols, formació de productes avançats de glicosilació (AGE), augment de receptors per AGEs, activació de PKC i inhibició de la producció d'eNOS entre d'altres efectes que, conjuntament, contribueixen al desenvolupament de la cardiomiopatia [27], [28].

### 1.2.3 Alteracions estructurals de la cardiomiopatia diabètica

La CMD es caracteritza estructuralment per la presència de fibrosis i hipertròfia ventricular esquerra (HVE). Els mecanismes pels quals es produeixen aquestes alteracions són diversos i es troben interrelacionats.

La fibrosi cardíaca es caracteritza per la presència anormalment alta de fibres de col·lagen principalment dels tipus I i III a l'espai que conforma la matriu extracel·lular (MEC). Per altra banda, la HVE es manifesta com un augment de la mida dels cardiomiòcits acompanyada de l'expansió de la MEC. Ambdues alteracions limiten greument la funció cardíaca fent a aquest òrgan energètica i hemo-dinàmicament menys eficient. Alguns dels factors que promouen la hipertròfia del teixit cardíac són la hiperglucèmia, la resistència a insulina i la producció de ROS que promouen l'expressió de gens implicats amb la hipertròfia com el factor de creixement TGF $\beta$ 1 o la endotelina-1 (ET-1). A més, també s'ha vist que TGF $\beta$ 1 participa en el procés fibròtic al cor mitjançant la regulació de precursors de la fibrosi. Aquest factor de creixement es troba augmentat en el cor de rates diabètiques i, tot i que no es coneixen tots els mecanismes, s'ha vist que la hiperglucèmia és un factor que estimula la seva expressió [29]. S'ha posat de manifest que una producció d'òxid nítric (NO) limitada juntament amb una producció de ROS incrementada produeixen l'activació de la via TGF $\beta$ 1/SMAD el que condueix a l'augment de la fibronectina (FN1) i les fibres de col·lagen a la MEC [16]. Per altra banda, la desregulació de la via de la insulina promou alteracions en el fluxos de Ca<sup>2+</sup> disminuint la quantitat de Ca<sup>2+</sup> del reticle sarcoplasmàtic i augmentant el Ca<sup>2+</sup> intracel·lular la qual cosa altera la relaxació del múscul cardíac. Més concretament, la via de la PI3K/AKT s'ha vist que esta implicada en la compartimentació del Ca<sup>2+</sup> al reticle a través del transportador SERCA2a [23], [30]. La relaxació ineficient del múscul cardíac és la principal causa mecànica de la insuficiència diastòlica i amb el temps contribueix, juntament amb la fibrosi de la MEC, al desenvolupament de la HVE.

### **1.2.4 Inflamació del teixit cardíac**

La CMD està lligada a la resposta inflamatòria i el seu origen és multifactorial [31]. La DM2 i la obesitat són dues de les afeccions que conformen la SMet, que es relaciona amb un estat proinflamatori degut als efectes directes de la hiperglucèmia, la hiperinsulinèmia i la hiperlipèmia sobre diferents teixits com el teixit adipós o els vasos sanguinis. Com a resultat, aquests produeixen diferents biomolècules inflamatòries que actuen localment al teixit (efecte autocrí) i, a més, poden ser alliberades al torrent sanguini i afectar a tot l'organisme (efecte endocrí) produint una inflamació crònica lleu [32]. Degut a la cronicitat de la SMet, la resposta antiinflamatòria es veu sobrepassada amb el temps i acaba produint una resposta adaptativa perjudicial. Les principals molècules proinflamatòries involucrades en la SMet són les citocines (IL6, TNF $\alpha$ , MCP-1, PAI-1, Proteïna C reactiva), les integrines (VCAM, ICAM, selectines) i les quimiocines (IL-8 i MCP-1) entre d'altres; tenen en comú l'activació de diferents vies intracel·lulars que promouen bé l'expressió d'altres molècules proinflamatòries per potenciar el senyal, o bé activen vies d'autofàgia i/o apoptosi. A més, també tenen activitat quimiotàctica el que atreu cèl·lules del sistema immune i en el cas de les integrines permeten l'adhesió cel·lular com passa per exemple, a l'endoteli vascular lesionat. També és important afegir que algunes d'aquestes molècules, com la IL6 o TNF $\alpha$ , poden activar vies com la de les MAPK [33] (c-JUN, pERK, p38) que provoquen la desregulació d'altres vies cel·lulars com la de la insulina (PI3K/AKT) [34]. També s'ha vist que altres com la PAI-1 poden induir vies encaminades a la hipertròfia (via TGF $\beta$ 1) o a afectar a la producció de NO en els vasos sanguinis i, per tant, contribuir a la disfunció endotelial [35].

### **1.3 Disfunció endotelial**

Està descrit que la DM2 deteriora l'activitat de la sintasa encarregada de la síntesi de l'òxid nítric a nivell endotelial (eNOS), així com també que estimula la producció de ROS i que aquests disminueixen la biodisponibilitat de NO [36].

Diversos biomarcadors estan relacionats amb els efectes de la DM2 sobre la funció endotelial dels que destaquen les molècules d'adhesió com VCAM i ICAM i marcadors d'inflamació com la proteïna C reactiva, el TNF $\alpha$  i la IL6 . A més, les pròpies lesions ateroscleròtiques de l'endoteli durant la diabetis, degut als elevats nivells circulants de glucosa i lípids, produeixen efectes locals de vasoconstricció, alteracions de la coagulació, agregació cel·lular, trombosis i inflamació [36]. Diversos estudis han posat de manifest un efecte beneficiós dels estrògens sobre l'endoteli vascular de forma directa [37] [38]. Pel que fa a les accions indirectes de l'estradiol sobre els factors de risc vascular es troba una millora en el perfil lipídic, una disminució de la glucèmia i un efecte antioxidant que redueix la formació de LDL oxidades, claus en la formació de la placa d'ateroma. Per altra banda, entre els efectes directes que modulen el to vascular, s'ha demostrat que l'estradiol produeix vasodilatació a través d'una major biodisponibilitat de NO i de la regulació de producció de prostaglandines, així com, contraresta els efectes vasoconstrictors de la endotelina-1 i de la vies nervioses simpàtiques [39]. No obstant, s'ha de destacar que les dones diabètiques tenen un risc cardiovascular igual o inclús superior al dels homes diabètics, la qual cosa posa de manifest que l'efecte cardioprotector dels estrògens desapareix en aquesta situació. Així, s'ha descrit que les dones premenopàusiques presenten una millor funció endotelial que els homes de la mateixa edat, no obstant, en presència de DM2 desapareixen les diferències entre sexes [40].

Per tant, l'evidència actual ens fa pensar que l'estradiol té un efecte beneficiós demostrat sobre el to vascular de rates femella sanes però en determinades situacions (com la DM2) aquest efecte beneficiós sembla que és anul·lat o inclús es produeix una situació paradoxal en la que les hormones sexuals femenines podrien agreujar les conseqüències vasculars de la pròpia DM2. Alguns autors [41] suggereixen que, a diferència dels mascles, el manteniment del to vascular en les femelles és dependent de les hormones sexuals, aleshores quan es redueix



la concentració plasmàtica d'estradiol amb l'edat, la funció endotelial es veu reduïda. Aquesta relació podria explicar la major mortalitat per accidents cerebrovasculars en dones (postmenopàusiques) respecte la dels homes. A més, la principal via a través de la qual l'estradiol estimula la síntesi de NO és l'eix PI3K/AKT que, curiosament, es troba fortament alterat durant la diabetis [8], fet que també podria explicar, a nivell vascular, el major risc de MCV en dones diabètiques vers dones sanes.

#### **1.4 Senyalització estrogènica al sistema cardiovascular**

Les hormones sexuals femenines (estrògens) són principalment sintetitzades als ovaris encara que poden ser produïdes de forma secundària en altres teixits com l'escorça suprarenal, el teixit adipós i els testicles. La principal hormona sexual femenina és el  $17\beta$ -estradiol (E2), el qual és sintetitzat a partir de la testosterona a través de l'enzim aromatasa o de l'estrone mitjançant l'enzim  $17$ -cetoreductasa. Altres hormones sexuals són l'estrone (E1) i l'estriol (E3) i els seus nivells plasmàtics estan estretament relacionats amb processos fisiològics com la menopausa i l'embaràs, respectivament. El principal rol de les hormones estrogèniques és el desenvolupament dels òrgans reproductors i la participació activa en la reproducció. Paral·lelament, les hormones sexuals també es veuen involucrades en nombrosos processos fisiològics. Per tant, alteracions en els nivells circulants d'aquestes hormones o en les seves vies de senyalització estan relacionades amb certes patologies com l'osteoporosi, el càncer, l'obesitat, les malalties cardiovasculars (MCV) [42], les malalties neuro-degeneratives [43] i les malalties autoimmunes [44]. Les seves propietats lipòfiles permeten la difusió a través de la membrana plasmàtica i possibiliten la interacció amb els receptors d'estrògens intracel·lulars.

Els dos receptors d'estrògens més coneguts són els receptors  $\alpha$  i  $\beta$  (ER $\alpha$  i ER $\beta$ ), que formen part d'una superfamília de receptors nuclears. La interacció de l'E2

amb aquests receptors, tal i com es pot veure a la figura 3 provoca la dimerització i translocació cap al nucli, on actuen com a factors de transcripció de gens que en el seu promotor presenten elements de resposta a estrògens (EREs) [45]. No obstant, l'E2 també pot modular l'expressió de gens que no contenen EREs a la regió del promotor [46]. A més, l'activació dels receptors ER $\alpha$  i ER $\beta$  també pot donar lloc a respostes no genòmiques a través de l'activació de cascades de cinases [47]. Ambdós receptors tenen elevada homologia i sovint comparteixen funcions en la senyalització dels estrògens, però s'han trobat algunes excepcions, amb funcions diferents entre ER $\alpha$  i ER $\beta$ . Per exemple, en cèl·lules endotelials s'ha vist que l'activació d'ER $\alpha$  promou l'expressió de PAI-1 mentre que l'activació selectiva de ER $\beta$  promou la seva supressió [48].

Més recentment, a principi del segle XXI, es va descobrir la participació d'un tercer receptor d'estrògens associat a proteïnes G anomenat GPER o GPR30 [49], al que se li ha atribuït la senyalització d'efectes ràpids de l'E2 [50]. A dia d'avui s'ha trobat que el GPER està distribuït àmpliament als diferents teixits que formen el sistema reproductor, endocrí, nerviós, immune, múscul-esquelètic i cardiovascular [51]. Així la senyalització dels estrògens, a través de GPER, adquireix complexitat tant per la quantitat de vies de senyalització dels estrògens en els diferents teixits com també per la regulació de la transmissió del senyal degut a fenòmens de *cross-talk* entre els diferents receptors [52]. A més, s'ha vist que GPER té afinitat no sols pels diferents estrògens sinó també per fitoestrògens amb característiques beneficioses (antioxidants, càrdioprotectores...) com la quercetina, el resveratrol o la oleuropeïna, així com també per disruptors endocrins d'origen sintètic com el bisfenol A o l'atrazina [51]. La principal via implicada en la senyalització del GPER és pel mecanisme típic dels receptors acoblats a proteïna G mitjançant cAMP i PKA i finalment l'activació de CREB. Altres mecanismes inclouen l'eix PI3K/AKT, l'activació de la proteïna cinasa C (PKC), així com, la mobilització de calci dels dipòsits intracel·lulars.

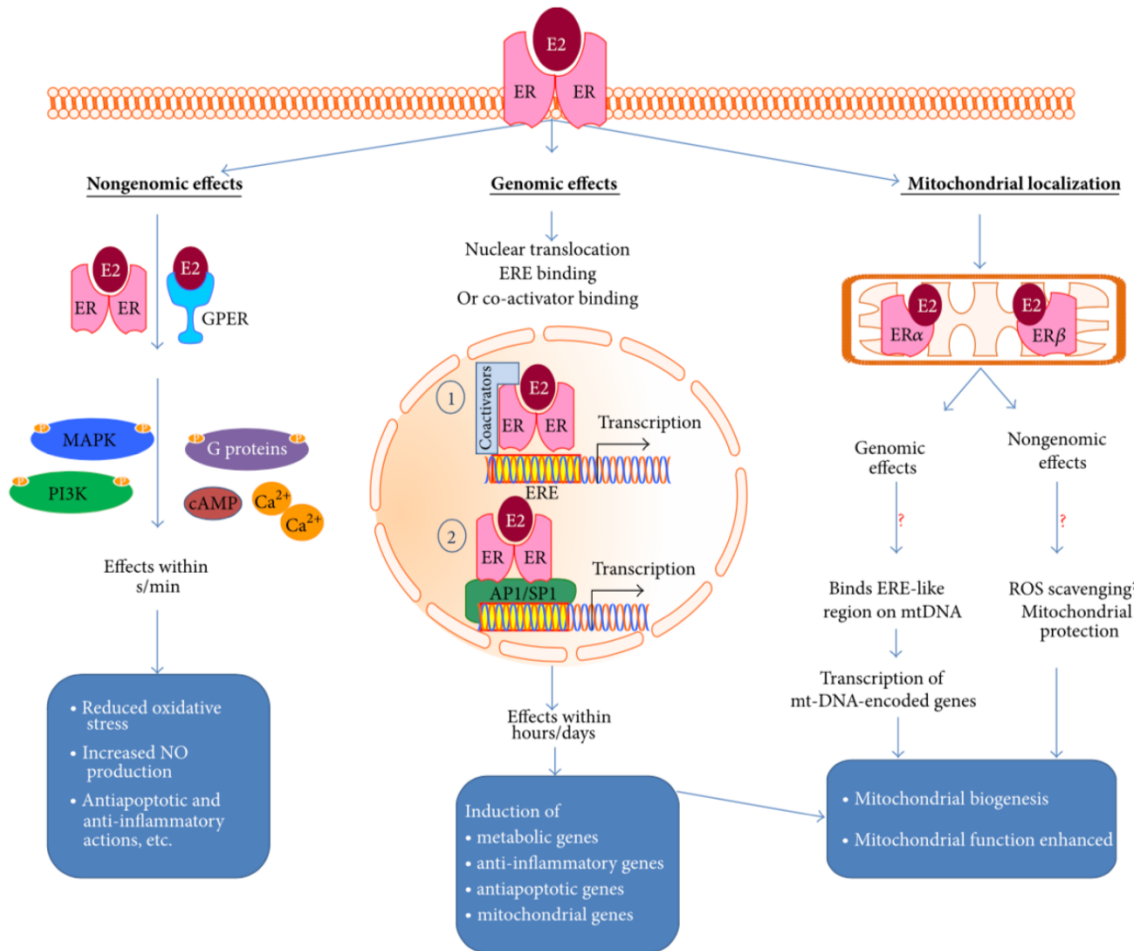


Figura 3. Vies de senyalització no-genòmica, genòmica i mitocondrial dels estrògens.

Font: *Estrogen: An Emerging Regulator of Insulin Action and Mitochondrial Function.* (2015) [53]



## **2. Objectius i plantejament experimental**

Els estudis realitzats en aquesta tesi doctoral es troben emmarcats dins la línia d'investigació del Grup de Metabolisme Energètic i Nutrició de la Universitat de les Illes Balears sobre els efectes de les hormones sexuals en l'homeòstasi energètica i la inflamació i a les seves implicacions fisiopatològiques. Més concretament, la present tesi doctoral forma part dels objectius del projecte SAF2016/80384R finançat pel Ministeri de Ciència i Innovació del Govern Espanyol, la finalitat del qual és estudiar l'efecte modulador dels estrògens sobre la funcionalitat del teixit adipós i la seva influència sobre la resposta cardiovascular en un entorn inflamatori.

La SMet és el terme que es fa servir per a designar a un conjunt de factors de risc associats al desenvolupament de DM2 i de MCV d'entre els que destaquen la hipertensió arterial, l'obesitat visceral, la dislipèmia i la hiperglucèmia. Per tant, l'estudi dels factors que modulen aquests factors de risc són una important diana terapèutica en la prevenció de la diabetis i les MCV. Sovint l'obesitat i la diabetis es presenten alhora, situació que es coneix com diabetis, i és sabut que la disfunció mitocondrial és un factor relacionat amb el seu desenvolupament i progressió. Per altra banda, s'ha vist que les hormones sexuals participen en la regulació de la biogènesi mitocondrial [54] i estudis previs en el nostre grup d'investigació han posat de manifest que les rates femella presenten una major diferenciació mitocondrial que els mascles en els teixits cardíac [55], adipós blanc [56], adipós marró [57], fetge [58]–[60], múscul esquelètic [61] i cervell [62]. S'ha proposat que, la major diferenciació mitocondrial present en els teixits de rates femella podria ser deguda a les hormones sexuals femenines i, aquest fet, podria contribuir a explicar la menor incidència de determinades malalties, entre elles la diabetis i les MCV, a les dones premenopàusiques. Així mateix, el declivi de les hormones sexuals femenines durant la menopausa s'ha relacionat precisament amb un increment dels factors de risc cardiovascular. En aquest sentit, en estudis realitzats amb rates ovariectomitzades (un model de menopausa) s'ha vist que la depleció hormonal condueix al deteriorament de la funció mitocondrial, augment

del pes corporal i de l'adipositat, així com, a un increment de la glucèmia i resistència a la insulina [63]–[66], el que posa de manifest l'efecte protector que tindrien les hormones sexuals en el desenvolupament d'aquestes condicions. En aquest sentit, les dades epidemiològiques en humans indiquen que el risc de morir per causes cardiovasculars és inferior en les dones premenopàusiques que en homes de la mateixa edat, no obstant, el risc entre sexes s'igualava amb l'arribada de la menopausa [67]. No obstant, recentment diversos estudis han posat de manifest que alguns factors com la diabetis confereixen el doble de risc de morir per MCV en dones premenopàusiques que en homes d'edat semblant [5]–[8]. Recentment, també s'ha vist que la teràpia hormonal substitutiva està associada a un increment del risc a nivell cardiovascular només quan s'inicia més enllà dels 5-10 anys d'haver començat la menopausa [68], [69]. Per tals motius, s'ha generat un interessant debat a la comunitat científica sobre el possible efecte dual, positiu o negatiu, dels estrògens en el desenvolupament de MCV en funció de l'entorn metabòlic de la pacient.

D'acord amb aquests antecedents i el bagatge del nostre grup en l'estudi dels efectes de les hormones sexuals sobre el metabolisme energètic, s'ha plantejat, com a **objectiu principal** d'aquesta tesi, dilucidar el paper de les hormones sexuals femenines, en concret el de l'E2, sobre la fisiopatologia cardiovascular en un context de diabetis. Aquest objectiu principal s'ha desglossat en cinc objectius específics que s'exposen a continuació. El **primer objectiu** ha estat caracteritzar a nivell sistèmic els efectes de la privació d'hormones ovàriques i el reemplaçament amb E2 sobre l'homeòstasi glucídica i altres marcadors de risc cardiovascular en un model de rates diabètiques. Per a la consecució d'aquest objectiu es varen emprar rates femella de la soca Zucker Diabetic Fatty (ZDF) que desenvolupen obesitat i diabetis per una mutació al receptor de la leptina. Es varen concretar 4 grups experimentals: un grup control de rates ZDF amb la mutació en heterozigosi (fa/+) que manifestaven un fenotip sa i tres grups de rates ZDF amb la mutació en homozigosi (fa/fa), que presentaven diabetis i

obesitat, dels quals hi havia un grup de rates control diabètiques sotmeses a una cirurgia d'ovariectomia simulada, un grup de rates sotmeses a ovariectomia bilateral per abolir la producció endògena d'estrògens i un grup de rates ovariectomitzades tractades amb E2 per via subcutània. Es varen determinar paràmetres biomètrics i el perfil circulant glucídic, lipídic, els nivells de leptina i d'adiponectina. També es varen dur a terme el test de tolerància a la glucosa i el de residència a la insulina. Els resultats i discussió referents a aquest objectiu es troben a l'apartat 4.1.

Durant l'obesitat, es produeix una deposició ectòpica de lípids que afecta a la majoria d'òrgans no adiposos de l'organisme, entre els que destaquen el fetge, el múscul esquelètic i el múscul cardíac [70]. Aquest fenomen produeix alteracions metabòliques en aquests teixits que acaben interferint en el correcte funcionament d'aquests òrgans, el que es coneix com lipotoxicitat [71]. Les principals conseqüències fisiopatològiques de la lipotoxicitat cardíaca són la resistència a la insulina, la mort cel·lular, la disfunció mitocondrial, la fibrosi i la disfunció contràctil [72]–[74]. A més, atesa la important contribució de la diabetis i la hiperglucèmia al desenvolupament de la patologia cardíaca [75] el **segon objectiu** s'ha centrat en estudiar l'efecte de les hormones sexuals femenines, i en concret l'E2, sobre l'homeòstasi energètica i redox cardíaca i els marcadors de disfunció tissular en el model de rates diabètiques ZDF. Per a dur a terme aquest objectiu es varen determinar, a teixit cardíac, marcadors de la funció mitocondrial, d'hipòxia, del to vascular i de fibrosi. A més, es va mesurar la taxa de respiració mitocondrial i la capacitat antioxidant i es varen determinar components de la via de senyalització de la insulina i de l'adiponectina, així com la dotació dels diferents receptors estrogènics. Els resultats i la discussió referents a aquest objectiu es troben a l'apartat 4.1.

L'estudi *in vivo* sobre els efectes de la lipotoxicitat al teixit cardíac de rates diabètiques, es va completar amb el **tercer objectiu** d'aquesta tesi que ha estat aprofundir en els possibles efectes moduladors de l'E2 en una línia cel·lular de



cardiomioblasts de rata, en un entorn lipotòxic. Per a dur a terme aquest objectiu es va utilitzar un model *in vitro* de lipotoxicitat cardíaca induïda amb palmitat a cèl·lules H9c2 tractades amb E2. Es varen determinar els efectes de l'E2, el palmitat i la combinació d'ambdós compostos sobre la viabilitat cel·lular, la producció de ROS i marcadors de funció mitocondrial, d'inflamació, d'apoptosi i de la via de senyalització de la insulina. Els resultats i la discussió referents a aquest objectiu es troben a l'apartat 4.2.

Un altre teixit que mereix una atenció especial a la diabetat, atesa la seva contribució al desenvolupament de la MCV [41], [76], és l'endoteli vascular. L'efecte sinèrgic de la hiperglucèmia i la hiperlipèmia característiques de l'estat diabètic s'associen a la disfunció endotelial. En aquesta línia, el **quart objectiu** s'ha dirigit a estudiar l'efecte de les hormones sexuals femenines, i en concret el de l'E2, sobre la disfunció endotelial en el model de rates diabètiques ZDF. Per a assolir aquest objectiu es va determinar, a l'aorta, l'expressió gènica de diferents gens implicats en el metabolisme de l'òxid nítric, l'angiogènesi, la inflamació, la funció mitocondrial i la fibrosi. Els resultats i la discussió referents a aquest objectiu es troben a l'apartat 4.3.

Per tal d'aprofundir en els efectes observats en les aortes del model de rates ZDF ovariectomitzades i/o tractades amb E2 es va plantejar el **cinquè objectiu** i darrer d'aquesta tesi, centrat en l'estudi dels efectes de l'E2 en un model de cèl·lules endotelials en condicions de glucolipototoxicitat. Per a dur a terme aquest objectiu es va utilitzar la línia de cèl·lules endotelials de cordó umbilical humà (HUVEC) incubades amb glucosa i palmitat per tal de simular l'entorn glucolipotòxic. En aquest estudi es varen determinar marcadors de disfunció endotelial i inflamació, així com també de biogènesi i funció mitocondrial. Els resultats i la discussió referents a aquest objectiu es troben a l'apartat 4.4.



### **3. Materials i mètodes**

### 3.1 Estudis *in vivo* amb rates ZDF

#### 3.1.1 Model animal Zucker Diabetic Fatty rats (ZDF)

El maneig dels animals així com tots els procediments experimentals es varen dur a terme seguint les directrius de la Unió Europea (2010/63/UE) i del Comitè Ètic d'Experimentació animal de la Universitat de les Illes Balears. Els animals utilitzats en aquesta tesi varen ser una soca de rates femella Zucker Diabetic Fatty (*Rattus norvegicus*) que tenen una mutació en el receptor de la leptina. Quan la mutació afecta als dos al·lels del gen (fa/fa), les rates manifesten un fenotip d'obesitat i DM2, mentre que si només hi ha mutació a un del dos al·lels del gen (fa/+), les rates presenten un fenotip sa. Els animals es varen mantenir allotjats a l'estabulari de la UIB (nivell 2) a una temperatura constant de 22°C amb una humitat relativa del 65 ± 3% i un fotoperíode de 12h de llum i 12h d'obscuritat. Els animals es varen estabular en grups de 2-3 fins el moment de l'ovariectomia o cirurgia simulada i després es varen mantenir estabulats de forma individual per assegurar el seu benestar. Les rates ZDF (fa/fa) es varen alimentar *ad libitum* amb una dieta especial (Research Diets, Ref: D12468) que assegura l'expressió del fenotip i les rates ZDF (fa/+) es varen alimentar *ad libitum* amb dieta estàndard (SAFE, Ref: A04/A04C/R04). La informació nutricional de cada dieta es pot consultar a la taula 1. L'accés a aigua va ser lliure en tot moment.

	Dieta rates fa/+ A04/A04C/R04	Dieta rates fa/fa D12468
Aportació calòrica (Kcal)	3438	4059
Proteïnes (% Kcal)	22,8	10,0
Lipids (% Kcal)	13,1	47,7
Hidrats de carboni (%Kcal)	64,1	42,4

**Taula 1. Composició calòrica i nutricional de les dietes utilitzades**

Font: SAFE i Research Diets.

Les rates ZDF varen ser adquirides a Charles River (França). Per motius experimentals només es varen fer servir les rates femella. Els mascles es varen destinar a cria o es varen cedir a la UIB per a dur a terme altres investigacions.

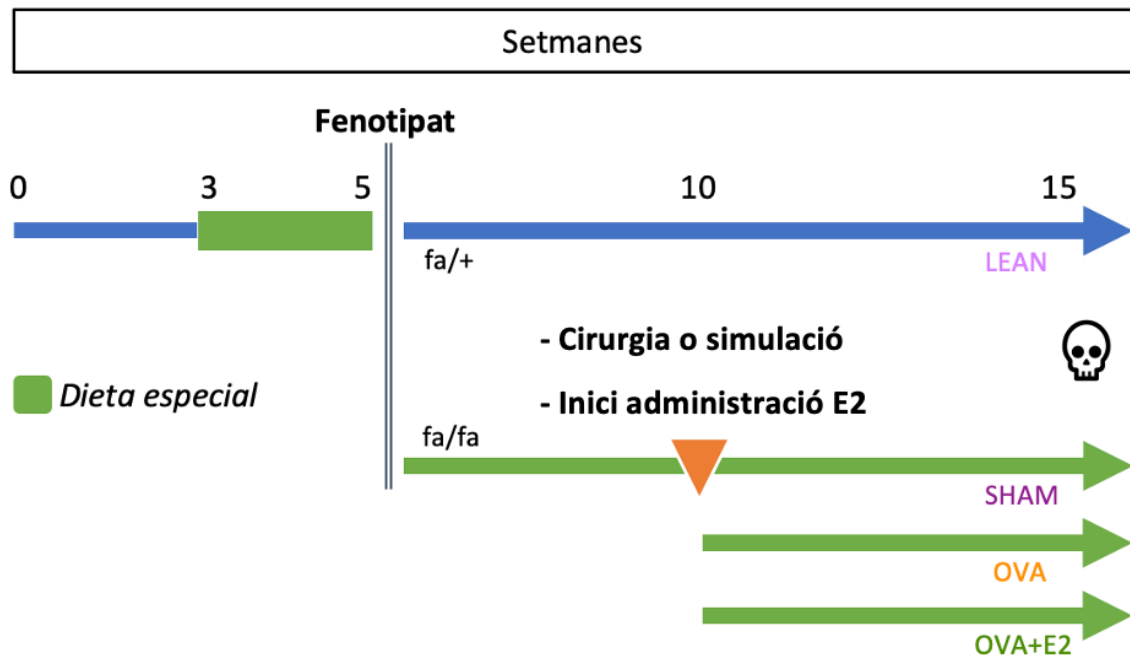
### **3.1.2 Manteniment de la colònia i fenotipat**

El manteniment de la colònia per obtenir animals d'experimentació es va fer a l'estabulari de la UIB a partir de rates ZDF mascles de genotip *fa/fa* i rates femella de genotip *fa/+*. Per obtenir creuaments satisfactoris, les femelles han de tenir almenys un al·lel del receptor de leptina no mutat ja que la leptina està involucrada en la reproducció. Els creuaments sempre es van fer aparellant un mascle i una femella coneguts per poder tenir un seguiment tant de l'eficàcia dels creuaments com per evitar al màxim l'endogàmia. Les parelles es deixaven a una sala de cria durant dues setmanes i a l'inici de la tercera setmana es retirava el mascle. Les cries es deixaven durant tres setmanes amb la mare i al començament de la quarta setmana es separaven mascles i femelles.

El genotipat de la descendència es va fer de forma indirecta a través del fenotip que manifestaven els animals quan es sotmetien durant quinze dies a una dieta especial (RD12468). Durant aquest període es va determinar el pes corporal de les rates ZDF cada dos dies i al final es podien distingir clarament dos grups. Les rates *fa/fa* presentaven un pes aproximadament un 40% superior al de les *fa/+*.

### **3.1.3 Procediments i tractaments experimentals**

Les rates ZDF *fa/fa* varen ser dividides en 3 grups experimentals (n=8) de forma aleatoritzada a les 5 setmanes d'edat i les rates ZDF *fa/+* varen ser utilitzades com a grup control (LEAN) (n=8). A la figura 4 es pot veure un cronograma dels procediments i tractaments.



**Figura 4. Cronograma dels procediments i tractaments experimentals**

*Elaboració pròpia*

Els 4 grups experimentals que es determinaren varen ser els següents:

**-LEAN:** rates ZDF *fa/+* alimentades amb dieta estàndard utilitzades com a grup control de rates sanes normopès i sense diabetis.

**-OVA:** rates ZDF *fa/fa* alimentades amb dieta especial i sotmeses a una cirurgia d'ovariectomia bilateral i a la implantació subcutània d'una mini-bomba osmòtica que contenia el vehicle del tractament.

**-OVA+E2:** rates ZDF *fa/fa* alimentades amb dieta especial i sotmeses a una cirurgia d'ovariectomia bilateral i a la implantació subcutània d'una mini-bomba osmòtica que contenia el tractament d'E2. La dosi administrada de E2 va ser de 3 µg/dia.

**-SHAM:** rates ZDF *fa/fa* alimentades amb dieta especial i sotmeses a una cirurgia simulada d'ovariectomia i d'implantació de mini-bomba osmòtica.

Tots els procediments quirúrgics es varen fer seguint el protocol proposat per la veterinària encarregada de l'estabulari i amb l'aprovació del Comitè Ètic d'Experimentació animal de la Universitat de les Illes Balears. Les operacions es

varen fer en les màximes condicions d'esterilitat que vam poder aconseguir (material quirúrgic esterilitzat per autoclau, material d'un sol ús estèril i utilització de camps quirúrgics). Els procediments es van fer amb els animals en dejuni de 2h i sota anestèsia general i medicació antiinflamatòria que es va repetir a les 24 i 48h. La duració de les operacions va ser d'aproximadament uns 30 minuts i després es varen deixar els animals operats en observació sobre una manta tèrmica durant unes 4 hores o fins que es despertaven de l'anestèsia. De les 26 operacions realitzades només vàrem tenir una mort, de causa desconeguda, a les 24h postovariectomia i una mort per depressió cardiorespiratòria quan s'induïa l'anestèsia a una rata del grup SHAM. Els protocols detallats de les cirurgies es poden consultar al protocol I.

### ***Ovariectomia bilateral***

A les 10 setmanes d'edat les rates ZDF *fa/fa* del grup OVA i OVA+E2 varen ser sotmeses a una ovariectomia bilateral amb la finalitat d'extirpar quirúrgicament els dos ovaris per eliminar el principal teixit productor d'hormones sexuals. De forma molt resumida, les rates s'anestesiaven per administració intraperitoneal d'una combinació de ketamina i xilacina i una vegada s'havia comprovat el seu efecte es realitzava una petita incisió a l'abdomen per on es realitzava l'ovariectomia. El procediment consistia en localitzar, suturar i escindir els dos ovaris, després es suturava per plànols l'abdomen (amb sutura reabsorbible) i la pell. Es deixaven els animals dins una gàbia sobre una manta tèrmica i es vigilaven fins la recuperació.

### ***Implantació subcutània de mini-bomba osmòtica (Alzet®)***

A les 10 setmanes d'edat les rates ZDF *fa/fa* del grup OVA+E2, immediatament després de procedir a l'ovariectomia bilateral, es va procedir a la implantació subcutània a la zona inter-escapular d'una mini-bomba osmòtica (Ref: 2006) per a alliberar una solució hidroalcohòlica d'E2 (860µg/ml) a raó de 0,15µl/h el que

equivaldria a una dosi diària d'E2 de 3µg. A les rates del grup OVA es va repetir el procediment amb la única diferència que les bombes portaven la solució hidroalcohòlica sense E2. La composició de la solució hidroalcohòlica va venir determinada per la baixa solubilitat de l'E2 en dissolucions aquoses i pels requeriments de compatibilitat de la mini-bomba amb dissolvents. Després de diverses proves de solubilitat es va decidir fer servir la següent composició recomanada per la casa comercial: etanol, DMSO i solució fisiològica en proporció 15:50:35. Per evitar la precipitació de l'E2, primer s'havia de dissoldre l'E2 en l'etanol, després afegir el DMSO i finalment la solució fisiològica.

#### ***Ovariectomia simulada (sham operation)***

A les 10 setmanes d'edat les rates ZDF *fa/fa* del grup SHAM varen ser sotmeses a una operació simulada de l'ovariectomia i de la implantació subcutània de la mini-bomba osmòtica. Els animals es varen tractar seguint els mateixos protocols que en els dues operacions però sense extirpar els ovaris ni implantar la bomba.

#### **3.1.4 Extracció de sang venosa i determinació de paràmetres circulants**

A partir de la setmana 6 d'edat es va extreure, setmanalment, sang de les venes laterals de la cua després d'un dejuni de 6h. Les cues es netejaven amb etanol i s'encalientien lleugerament entre les mans fent un massatge en sentit proximal-distal. A continuació es canalitzava la vena amb una agulla de calibre 25G i es procedia a recollir la sang en tubs Microvette 200 Z<sup>®</sup> (Ref: 201290) per obtenir sèrum i en tubs Microvette<sup>®</sup> 200 K3E (Ref: 201288) per obtenir plasma i sang total. Aquestes mostres es centrifugaven posteriorment per obtenir el sèrum (10.000g, 10 minuts, 4°C) i el plasma (2.000g, 5 minuts, 25°C). El sèrum, el plasma i la sang total (sang recollida en tubs K3E sense centrifugar) es guardava en tubs de polipropilè a -80°C fins al moment del seu ús. Paral·lelament, s'obtenia una gota de sang fresca per a fer determinacions de glucosa amb l'aparell Accu-



check® Nano (Roche®). A la taula 2 es poden consultar les característiques principals de cada determinació.

Analit	Tipus de mostra	Dilució	Tècnica /Aparell o KIT
Glucosa	Sang total	Directe	Química seca / Accu-chek
Triglicèrids	Sèrum	Directe	Colorimetria / Cromatest
HbA1c	Sang total	Directe	ELISA / Crystal Chem (Ref: 80300)
Colesterol-LDL	Sèrum	Directe	Colorimetria / Cromatest
NEFA	Sèrum	Directe	Colorimetria / Cromatest
Insulina	Sèrum	Directe	ELISA / Crystal Chem (Ref: 90060)
Adiponectina	Sèrum	1/3000	ELISA / Crystal Chem (Ref: 80570)

**Taula 2. Determinacions realitzades a partir de sang o sèrum.**

*Elaboració pròpia.*

### **3.1.5 Determinació de la tolerància oral a la glucosa (OGTT) i la tolerància a la insulina (ITT)**

A la setmana 14 es va procedir a realitzar els tests OGTT i ITT per a determinar el grau de resposta enfront una sobrecàrrega oral de glucosa i la sensibilitat a una injecció d'insulina exògena. Aquestes dues proves són molt utilitzades en models de DM2 per a determinar quan avançada està la patologia i determinar la capacitat de resposta de l'organisme.

Tan la OGTT com la ITT es varen fer després d'un dejuni de 6h i separades 2 dies entre elles. Les mostres de sang es varen obtenir per punció de les venes laterals de la cua i es va determinar la glucèmia amb l'aparell Accu-chek® Nano (Roche®).

#### **OGTT**

Amb una sonda gàstrica flexible (∅ 18GA x 17mm) es va administrar un volum suficient d'una solució de D-glucosa (0,5g/ml) per administrar 1g glucosa/Kg pes

corporal (Ref: G8270-1KG). La concentració de la solució es va calcular prèviament per tal de no haver d'administrar un volum superior a 5ml/Kg (volum màxim administrable a petits rosegadors). Les determinacions de glucèmia es varen fer abans d'administrar la solució (temps 0) i als 5, 10 15, 30, 60 i 120 minuts postadministració.

### **ITT**

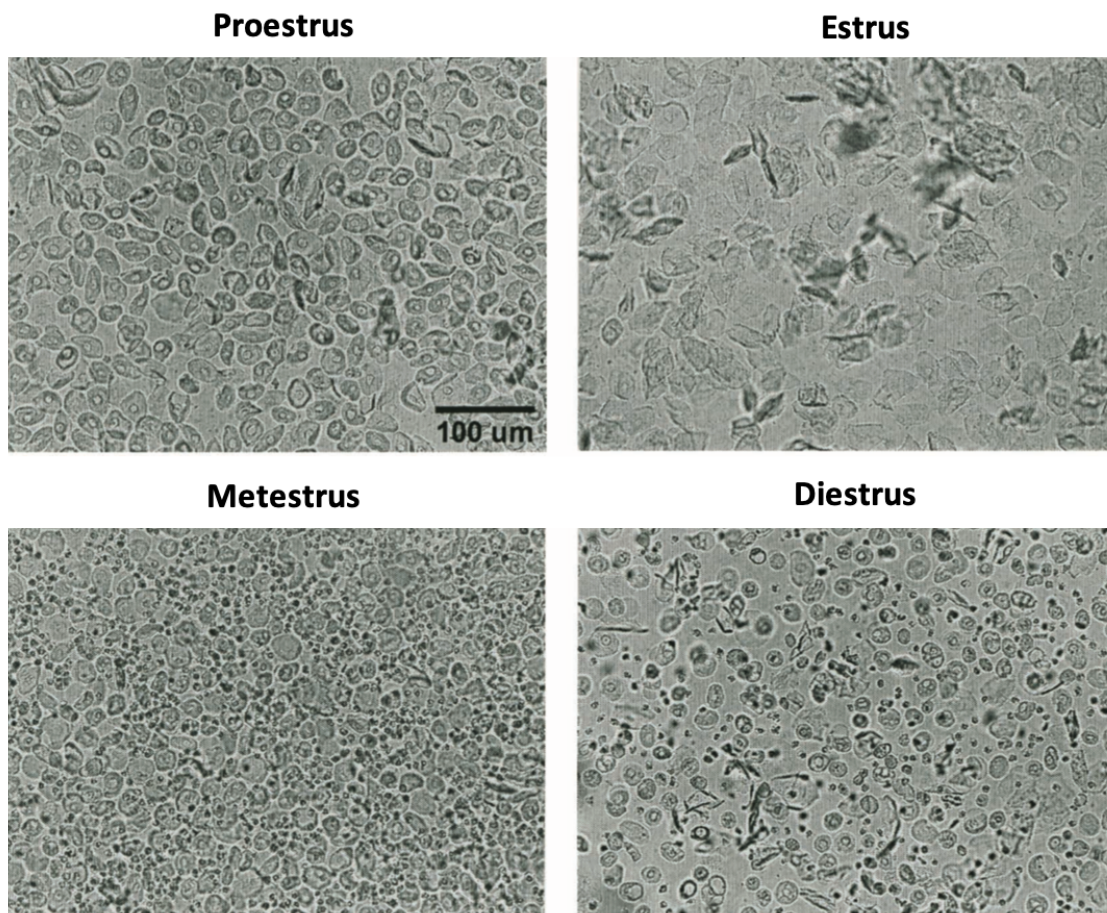
Es va administrar per via subcutània (flanc posterior) un volum suficient d'una solució d'insulina (1U/ml) per administrar una dosi de 1U/Kg.

Per a poder administrar la dosi necessària de 1U/Kg es va haver de fer una dilució 1/100 de la solució comercial (Humulina® regular 100U/ml, Lilly). La dilució es va dur a terme en condicions d'esterilitat i es va utilitzar una solució fisiològica estèril i apirògena. Les determinacions de glucèmia es varen fer abans d'administrar la solució (temps 0) i als 5, 10, 15, 30 i 40 minuts posteriors. Com a mesura de benestar animal, a les rates *fa/+* es va administrar una solució de glucosa (0,5g/ml) per via oral si la seva glucèmia baixava en algun moment de 50mg/dl o al finalitzar el test per evitar una hipoglucèmia que posés en perill la vida de l'animal. En rates *fa/fa* no es va donar la necessitat.

### **3.1.6 Determinació del cicle estral**

Al grups SHAM i LEAN, durant la setmana del sacrifici es va determinar el moment del cicle estral en el que es trobaven les rates per sacrificar-les durant el proestri, ja que és el moment en el que l'estradiol presenta els majors nivells en sang. Per a la determinació del cicle es procedia a fer un frotis vaginal amb un bastonet de cotó impregnat amb solució fisiològica que s'introduïa suaument per la vagina i es feia girar. A continuació, es fregava el cotonet a sobre d'un portaobjectes de vidre i es mirava al microscopi. A la figura 5 es poden observar captures representatives de cada fase. Les rates dels grups OVA i OVA+E2, es varen

sacrificar qualsevol dia de la setmana 15 ja que no segueixen el cicle estral degut als procediments experimentals.



**Figura 5. Fotografies de frotis vaginals representatius de les diferents fases del cicle estral a rata.**

*Font: A quantitative method for assessing stages of the rat estrous cycle. (2005) [77]*

### **3.1.7 Eutanàsia i extracció de teixits.**

#### ***Eutanàsia***

A les 15 setmanes d'edat es va procedir al sacrifici dels animals experimentals per decapitació amb guillotina. No es va utilitzar cap tipus d'anestèsia prèvia per no interferir amb els resultats.

El dia de la eutanàsia els animals es varen sotmetre a un dejuni de 6h i es van extreure mostres de sang per a obtenir sèrum, plasma i sang total (consultar el procediment a l'apartat 3.1.4). Inmediatament després de l'extracció es va procedir al seu sacrifici i a l'obtenció de teixits.

### ***Extracció dels teixits***

Després de la decapitació es va procedir a extreure els principals òrgans d'interès (cor i aorta) amb la major rapidesa possible. Primerament, es polvoritzava etanol 75% sobre l'abdomen de la rata per evitar que es despreguessin pèls que contaminarien les mostres.

A continuació, es realitzava una incisió vertical per deixar exposades les cavitats abdominal i toràcica. Els teixits es treien, es pesaven i es processaven en funció de les necessitats: aïllament mitocondrial o congelació en nitrogen líquid (RNA i proteïna). En primer lloc es va extreure el cor perquè es va fer servir per obtenir mitocondris aïllats (veure protocol IV) i el seu processament havia de ser ràpid per evitar la degradació d'aquest òrganul. La resta d'aquest òrgan es va trossejar amb tisores dins un tub i es va congelar amb nitrogen per al seu ús posterior (extracció de proteïna i RNA). Seguidament, es va obtenir l'aorta, des de la seva inserció al cor (arc aòrtic) fins a la part més caudal (artèries ilíaqües). L'aorta es troba recoberta de teixit adipós i en algunes regions per teixit muscular que van haver de ser separats de l'aorta abans de congelar-la en nitrogen líquid. Per a la correcta dissecció, l'aorta va ser manipulada sobre una placa congelada i es va netejar de restes de sang amb solució fisiològica freda. Una vegada l'aorta estava correctament processada, es congelava amb nitrogen líquid i es guardava a -80°C per al seu ús posterior (extracció de RNA). Posteriorment es va procedir a extreure la resta de teixits i òrgans (teixit adipós blanc retroperitoneal, teixit adipós blanc gonadal, teixit adipós blanc mesentèric, teixit adipós blanc perirenal, teixit adipós blanc inguinal, teixit adipós marró, fetge i úter) i una vegada pesats es varen congelar en nitrogen líquid i després a -80°C.

### **3.1.8 Consum d'oxigen en mitocondris aïllats de teixit cardíac**

El consum d'oxigen es va mesurar amb un elèctrode d'oxigen polarogràfic tipus Clark (Oxygraph®, Hansatech). El sistema Oxygraph® està format per una cambra de treball connectada a un ànode de plata, a un càtode de platí i a una membrana

permeable a l'oxigen i un electròlit de clorur de potassi. El fonament d'aquest sistema consisteix en que l'oxigen difón a través de la membrana permeable cap al càtode i, sota un voltatge polaritzant, és oxidat a  $\text{OH}^-$  amb una reducció paral·lela de l'aigua a  $\text{H}_2\text{O}_2$ . A l'ànode, la plata reacciona amb el clor i dona lloc al clorur de plata. Aquestes reaccions generen un flux de corrent que és proporcional al consum d'oxigen durant el procés.

El protocol en detall de l'aïllament de mitocondris del teixit cardíac així com el consum d'oxigen mitjançant el sistema Oxygraph® es pot consultar al protocol IV. De forma resumida, a continuació, apareixen els principals estats que varem mesurar, així com, els components químics que es varen fer servir per aconseguir aquests resultats i la principal informació que ens dona cada estat.

- **Respiració basal** (*estat II*): és la primera mesura que es registra del consum d'oxigen (OCR; *oxygen consumption rate*) on s'afegeixen els substrats, en aquesta tesi, succinat que activa la cadena de transport d'electrons a través del complex II.
- **Respiració estimulada per ADP** (*estat III*): l'addició d'ADP com a substrat de l'enzim ATP sintasa (ATPasa) ens permet enregistrar la respiració mitocondrial acoblada a l'ATP.
- **Respiració dependent d'ATP i "proton leak"** (*estat IV*): s'afegeix oligomicina, un inhibidor de la ATPasa, el qual bloqueja el flux de protons a través de la membrana interna mitocondrial. Com a resultat, s'inhibeix el funcionament de la cadena respiratòria i el consum d'oxigen disminueix. El consum d'oxigen residual que es manté en aquest punt es registra com a fuita de protons (*proton leak*), que es bombegen a través de la membrana mitocondrial consumint oxigen però sense produir ATP.
- **Respiració màxima** (*estat V*): es mesura addicionant un desacoblant del gradient de protons, com és el FCCP, d'aquesta manera la respiració mitocondrial s'estimula al màxim i el consum d'oxigen incrementa ràpidament.

- **Respiració no mitocondrial:** aquest paràmetre és un índex del consum d'oxigen degut a processos cel·lulars que no provenen de la mitocondria. L'addició de rotenona i antimicina A, inhibeixen els complexos I i III, respectivament, i ens permeten calcular el consum d'oxigen independent del mitocondri.

## **3.2 Estudis *in vitro* amb cardiomioblasts H9c2**

### **3.2.1 Línia cel·lular H9c2**

La línia cel·lular H9c2 (Ref: ATCC®, CRL-1446) deriva d'un clon de mioblasts BDIX aïllat de cor d'embrions de rata per Kimes i Brandt el 1976. Les H9c2 són cardiomioblasts amb capacitat adherent i que presenten característiques típiques de cèl·lules cardíques.

Tots els estudis realitzats amb H9c2 es van realitzar en condicions d'esterilitat per a reduir el risc de contaminació per bacteris o fongs. Per tant, tot el material que es va fer servir, o bé es va comprar estèril (plaques, pipetes serològiques, medis, sèrum, etc. ) o va ser esterilitzat al laboratori per autoclau (puntes i PBS) o per filtració (solucions de treball no autoclavables, com per exemple, els tractaments). La manipulació de les H9c2 es va realitzar en cabines de seguretat de classe I ja que aquesta línia cel·lular requereix un nivell de bioseguretat 1.

### **3.2.2 Manteniment i subcultiu de les H9c2**

El manteniment i subcultiu de les H9c2 es va fer seguint les instruccions de la casa comercial. Les condicions de temperatura i CO<sub>2</sub> varen ser estàndard (37°C i 5% CO<sub>2</sub>) i el medi de cultiu rutinari consistia en DMEM (Ref: Dulbecco's Modified Eagle's Medium. Gibco™, 11965092) alt en glucosa (4,5g/L) suplementat amb un 10% de FBS (Ref: Biowest, S181B) i antibiòtics (penicil·lina 100 U/ml, estreptomycin 0.1 mg/ml. Ref: Biological Industries, 03-031)

Les cèl·lules es feien créixer en plaques de poliestirè de 55 cm<sup>2</sup> d'àrea i es canviava el medi cada 2-3 dies fins que ocupaven un 70-80% de la superfície, moment el

qual es passaven a una placa nova generalment seguint un rati 1:2 (el contingut d'una placa es passava a dues plaques per augmentar l'àrea de creixement). Per desenganxar les cèl·lules de la base de la placa i poder-les transferir a una de nova, es feia servir una solució amb tripsina i EDTA (0,25% i 0,02%. Ref: Biowest, X0930) que rompia les unions cèl·lula-cèl·lula i cèl·lula-placa. El procediment es troba d'escrit amb més detall al protocol II.

### **3.2.3 Congelació i descongelació**

Les cèl·lules H9c2, com moltes altres, poden ser emmagatzemades en nitrogen líquid sense que morin. Per tal de tenir un *stock* suficient de cèl·lules que permeti realitzar els experiments, així com també, tenir un *stock* de reserva en cas de patir alguna contaminació, de forma rutinària, es realitzava la congelació de lots de cèl·lules.

Aquest procediment és relativament senzill però cal tenir present una sèrie de detalls molt importants. Durant la congelació es formen microcristalls d'aigua que són letals per a les cèl·lules, per evitar-ho és important utilitzar un crioprotector com el DMSO (5%). La velocitat de congelació/descongelació també és important, mentre que la congelació ha de ser lenta i progressiva la descongelació ha de ser ràpida ja que les cèl·lules no poden quedar-se massa temps en la solució de DMSO per resultar tòxica. Per tal d'aconseguir-ho, per a la congelació s'utilitza un recipient especial com el MrFrosty™ (Thermofischer) que conté isopropanol. Aquest recipient es deixa a -80°C durant unes 4 hores i permet un descens controlat de la temperatura de 1°C per minut. A les 4 hores, els vials amb les cèl·lules es poden passar al contenidor amb nitrogen líquid. La descongelació es realitza descongelant el contingut del vial amb petites quantitats de medi de cultiu a 37°C i transferint-les a un tub nou. El procediment en detall es troba d'escrit al protocol II.

### 3.2.4 Tractaments

Per a dur a terme els experiments realitzats en aquesta tesi es van fer servir diferents tractaments amb 17 $\beta$ -estradiol (E2), palmitat (PA) i ciclosporina A (CsA). Les concentracions dels tractaments i el temps utilitzats es troben d'escrits a la taula 3 i les figures de l'apartat 4.2. Cal destacar que en els tractaments combinats (E2+PA o CsA+E2+PA) les H9c2 varen ser tractades durant 24h amb E2 i 1 hora amb CsA prèviament al tractament amb E2+PA o CsA+E2+PA, segons correspongués. El tractament previ va ser eliminat de les plaques i substituït per la combinació corresponent.

Tractament	Concentració	Temps (h)	Dissolvent	Referència
E2	10 nM	6, 9, 16, 24	Etanol	Sigma, E2758
PA	200 $\mu$ M	6, 9, 16, 24	Solució aquosa BSA 5mM	Sigma, P0500
CsA	1 $\mu$ M	9, 16, 24	Aigua bidestil·lada	Tocris, 101

**Taula 3. Tractaments realitzats a les H9c2.**

*Elaboració pròpia.*

Les condicions de temperatura i CO<sub>2</sub> durant els experiments varen ser les mateixes que durant el manteniment, no obstant el medi de cultiu va ser diferent. Degut a certa activitat estrogènica observada en el roig fenol [78], 24 hores abans del tractaments i durant aquests es feia servir DMEM sense roig fenol (Ref: Gibco™, 21063) suplementat amb un 10 % de FBS filtrat amb carbó actiu i lliure de molècules apolars que poguessin tenir possibles efectes estrogènics (Ref: Reactiva, S181B). El còctel d'antibiòtics va ser el mateix que el dels medi de manteniment.

Els experiments que tenien per objectiu obtenir proteïna i/o RNA es varen realitzar en plaques de 6 pous amb una densitat de sembra de 200.000 cèl·lules



per pou (100.000 cèl·lules/ml). Per altra banda els experiments de viabilitat, contingut mitocondrial, producció de ROS i contingut d'ATP com que es determinaven per mètodes fluorescents o espectrofotomètrics es varen realitzar en plaques de 96 pous a raó de 10.000 cèl·lules per pou (100.000 cèl·lules/ml).

### ***Preparació del palmitat***

L'àcid palmític, degut a la seva naturalesa hidrofòbica, no pot ser dissolt directament en dissolvents aquosos per tant s'ha d'augmentar la seva solubilitat convertint l'àcid palmític en palmitat sòdic i acomplexant aquest sal amb albúmina (BSA).



Inicialment es va preparar una solució d'àcid palmític (Sigma, P0500) 50 mM en una solució de NaOH 0,1 N i es va encalenticir a 70 °C durant 15 minuts per fer la sal. Inmediatament després, es va dissoldre el palmitat sòdic en una solució de BSA (lliure d'àcids grassos. Ref: Sigma, A7030) en quantitat suficient per obtenir una solució de palmitat 5 mM (el rati final PA:BSA va ser 4:1). Aquesta solució es va incubar a 50 °C durant 30 minuts en agitació per a la formació dels complexos PA-BSA.

Paral·lelament es va preparar una solució vehicle seguint els mateixos passos però sense dissoldre l'àcid palmític. Finalment, ambdues solucions varen ser filtrades ( $\phi$  0,2  $\mu\text{m}$ ) i guardades en alíquotes a -20 °C durant 1 mes com a màxim.

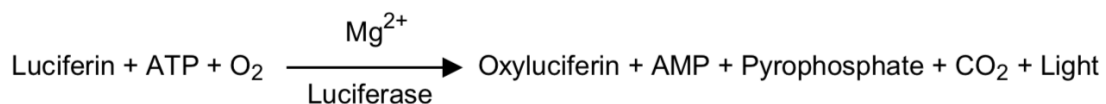
### **3.2.5 Determinació de la viabilitat**

La viabilitat cel·lular es va determinar mitjançant Prestoblue (Ref: Thermofisher, A13262). Aquest mètode es basa en un compost derivat de la resazurina que quan és captat per cèl·lules vives es redueix donant lloc a un component fluorescent que pot determinar-se per fluorescència (Ex560/Em590). La determinació es va fer en plaques de 96 pous després de realitzar els diferents experiments. Es va

eliminar el medi i es va procedir a dipositar 100 µl d'una solució de Prestoblue en medi de tractament (DMEM *high glucose* sense roig fenol + 10 % FBS) al 10 %. Aquesta solució es va deixar en contacte amb les cèl·lules durant 10 minuts a l'incubador (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) i a continuació es va llegir la placa al fluorímetre (FLx800™, Biotek™).

### 3.2.6 Determinació de la quantitat d'ATP

El contingut relatiu d'ATP en les cèl·lules H9c2 es va determinar amb un kit comercial bioluminescent seguint les instruccions del fabricant (Ref: ApoSENSOR, BioVisión, K254). La tècnica es basa en la utilització de l'enzim luciferasa que interactua amb l'ATP de la mostra per a produir llum.



Breument, la determinació es va realitzar en una placa de cultiu de 96 pous després de realitzar els tractaments. Després d'eliminar els tractaments, 100 µl de tampó de lisis es varen dipositar a cada un dels pous i es va incubar durant 5 minuts a temperatura ambient i sota agitació suau. A continuació es varen afegir 10 µl de la solució de treball, que conté l'enzim i els substrats, i es va procedir ràpidament a llegir la producció de llum en un luminòmetre (FLx800, Bio-tek™).

### 3.2.7 Determinació del contingut mitocondrial (MTG)

El contingut mitocondrial a les cèl·lules H9c2 es va determinar amb la sonda mitocondrial fluorescent Mitotracker™ green (MTG) (Ref: Thermofisher, 7514). Aquesta molècula es capaç d'acumular-se als mitocondris i unir-se covalentment a proteïnes mitocondrials independentment del potencial de membrana. Així doncs, la seva presència es relaciona més amb el contingut de proteïna mitocondrial que no pas en la seva funcionalitat.

La determinació del contingut mitocondrial es va realitzar en plaques de 96 pous després de realitzar els tractaments. Es va aspirar el medi de cultiu i es van afegir

100 µl d'una solució de MTG 200 nM (DMEM *high glucose* sense roig fenol + 10 % *charcoal*-FBS) i es va mantenir la placa durant 30 minuts a l'incubador (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Posteriorment es va aspirar el contingut dels pous i es va procedir a fer dos rentats amb PBS (37 °C) i posteriorment es va determinar la fluorescència (Ex490/Em516) al fluorímetre (FLx800™, Biotek™). Els resultats obtinguts es varen normalitzar amb les dades de viabilitat cel·lular (veure apartat 3.2.5) obtingudes a una placa paral·lela amb cèl·lules sotmeses als mateixos tractaments i condicions.

### 3.2.8 Determinació de la producció d'ió superòxid

La detecció de l'ió superòxid (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) en les cèl·lules H9c2 es va realitzar mitjançant la sonda fluorescent MitoSOX™ (Ref: Thermofisher, M36008). Aquesta molècula és dirigida selectivament als mitocondris on és oxidada específicament per l'ió superòxid donant lloc a un compost fluorescent. La determinació es va realitzar en una placa de 96 pous després dels tractaments experimentals i es va fer seguint el protocol recomanat per la casa comercial. De forma resumida, es va aspirar el medi de cultiu i es va incubar les cèl·lules amb una solució de MitoSOX™ 5 µM en DPBS (Glucosa/Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>) durant 20 minuts. A continuació es va llegir la fluorescència (Ex510/Em580) en un fluorímetre (FLx800™, Biotek™). Es recomana no fer servir FBS ni roig fenol ja que podria interferir en el correcte funcionament de l'assaig. Després de diverses proves es va decidir fer servir DPBS suplementat amb glucosa a la mateixa concentració que el medi de cultiu i amb Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> perquè sinó les cèl·lules es desadherien de la placa. Paral·lelament, es va fer servir un control positiu tractant alguns pouets amb antimicina A 100 µM durant 30 minuts per comprovar el correcte funcionament de la sonda.

*Composició DPBS (Glucosa/Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>):* NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2mM, CaCl<sub>2</sub> 1mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM, Glucosa 25mM i pH 7,4.

### **3.3 Estudis in vitro amb cèl·lules endotelials HUVEC**

#### **3.3.1 Línia cel·lular HUVEC**

Les cèl·lules HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) es varen a adquirir a ATCC® (Ref: CRL-1730) i es tracta d'una línia cel·lular no immortalitzada derivada de cèl·lules endotelials de cordó umbilical humà i són una de les línies més utilitzades en estudis *in vitro* com a model per estudiar la patologia endotelial.

Tots els estudis realitzats amb les HUVEC es varen realitzar en les mateixes condicions d'esterilitat comentades a l'apartat 3.2.1.

#### **3.3.2 Manteniment i subcultiu de les HUVEC**

El manteniment i subcultiu de les cèl·lules HUVEC es va dur a terme d'acord a les indicacions tècniques del proveïdor. Les condicions de temperatura i CO<sub>2</sub>, varen ser les mateixes que amb les H9c2 però el medi de cultiu va ser l'F12-K (Kaighn's Modification of Ham's F-12 Medium. Ref: ATCC®, 30-2005™) baix en glucosa (7 mM) suplementat amb un 10 % de FBS (Ref: Biowest, S181B) i antibiòtics (penicil·lina 100 U/ml, estreptomicina 0.1 mg/ml. Ref: Biological Industries, 03-031).

Les cèl·lules es feien créixer en flascons de 175 cm<sup>2</sup> i es canviava el medi fins que ocupaven un 70-80% de la superfície, moment en el que es procedia al subcultiu amb un rati 1:3 i seguint el mateix protocol que amb les H9c2.

#### **3.3.3 Congelació i descongelació**

El procediment que es va seguir va ser el mateix que amb les cèl·lules H9c2.

### 3.3.4 Tractaments

Per a dur a terme els experiments realitzats en aquesta tesi es van fer servir diferents tractaments amb E2, glucosa i PA i les concentracions dels tractaments i el temps utilitzats es detallen a la taula 4 i al peu de les figures del capítol 4.4.

Tractament	Concentració	Temps	Dissolvent	Referència
E2	10 nM	24h	Etanol	Sigma, E2758
Glucosa	30 mM	24h	Aigua bidestil·lada	G8270-1KG
PA	200 $\mu$ M	24h	Solució aquosa BSA 5mM	Sigma, P0500

**Taula 4. Tractaments realitzats a les HUVEC.**  
*Elaboració pròpia.*

Els experiments es varen realitzar en plaques de 6 pous amb una densitat de sembra de 100.000 cèl·lules per pou (50.000 cèl·lules/ml) i les condicions de temperatura i CO<sub>2</sub> durant els experiments varen ser les mateixes que durant el manteniment, no obstant el medi de cultiu va ser diferent. Degut a certa activitat estrogènica observada en el roig fenol [78], 24 hores abans del tractaments i durant aquests es feia servir M199 sense roig fenol (Ref: Gibco™, 11510386) suplementat amb un 10 % de FBS filtrat amb carbó actiu i lliure de molècules apolars que poguessin tenir possibles efectes estrogènics (Ref: Reactiva, S181B), 25 mM HEPES (Ref: Gibco™, 11560496), 2 mM de piruvat sòdic, 3mg/ml d'ECGS (factors de creixement) i 22,5 mg/ml d'heparina (Ref: PromoCell, C-30120). El còctel d'antibiòtics va ser el mateix que el dels medi de manteniment.

### 3.4 Metodologia general

#### 3.4.1 Obtenció de proteïna del cor

L'obtenció de proteïna cardíaca es va fer a partir dels fragments cardíacs que varen quedar després d'agafar la mostra per a l'aïllament mitocondrial.

Resumidament, una quantitat de teixit corresponent a 100 mg es dipositava dins un tub amb tampó de lisis STE i un còctel d'inhibidors de proteases i fosfatases (HALT™. Ref: ThermoFisher, 78443) i amb l'ajuda d'un homogeneïtzador mecànic (Politró®) es trencaven les fibres musculars i s'alliberava el contingut proteic. A continuació es completava l'homogeneïtzació amb ultrasons i posteriorment es centrifugava per obtenir un sobrenedant lliure de fragments cel·lulars i proteïnes fibroses no homogeneïtzades. Tot el procés es feia en fred per evitar la degradació de les proteïnes. Per aquesta quantitat de teixit, la concentració final de proteïna del sobrenedant solia estar entorn un 10-15 µg/µl. El procediment detallat pot consultar-se al protocol III.

#### 3.4.2 Obtenció de proteïna de cèl·lules H9c2

Com ja s'ha comentat a l'apartat 3.2.4, la proteïna s'obtenia de cèl·lules H9c2 sembrades a plaques de 6 pous i la concentració de proteïna que s'obtenia amb les condicions explicades de sembra era d'aproximadament 1,5-2 µg/µl.

Resumidament, es retirava el medi de cada pou i es feia un rentat amb PBS i a continuació es dipositaven uns 120 µl de tampó d'homogeneïtzació RIPA amb còctel d'inhibidors de proteases i fosfatases (HALT™). Amb la placa sobre gel, mitjançant un *scraper* es rascava la superfície de la placa per lisar les cèl·lules. Finalment es recollia la solució, es deixava 15 minuts en agitació a 4°C i es centrifugava per obtenir un sobrenedant lliure de fragments cel·lulars no dissolts. El procediment detallat pot consultar-se al protocol III.

### 3.4.3 Quantificació de proteïna

#### *Mètode de l'àcid bicinconínic (BCA)*

La quantificació de proteïna en els homogenats de teixit cardíac i de cèl·lules H9c2 es va fer per mitjà del mètode BCA (Ref: Thermoscientific, 23227) seguint el protocol del fabricant. Aquest mètode es basa en la reducció d'ions cúprics ( $\text{Cu}^{2+}$ ) a ions cuprosos ( $\text{Cu}^+$ ) per part de les proteïnes en condicions alcalines. A continuació els ions cuprosos reaccionen amb el BCA, que canvia de color de verd a rosat en funció de la quantitat de proteïna present a la mostra i pot mesurar-se per espectrofotometria a  $\lambda = 562\text{nm}$ . La quantitat de proteïna pot determinar-se per interpolació dels resultats a una corba patró amb un rang de 25 a 2.000  $\mu\text{g}$  proteïna/ml.

#### *Mètode de Bradford*

Aquest mètode va ser utilitzar per determinar la quantitat de proteïna de l'aïllat mitocondrial ja que és un mètode ràpid i econòmic però que només pot ser usat en mostres que no tenen grans quantitats de detergents, com és el cas del tampó d'aïllament mitocondrial (composició disponible al protocol IV).

Aquest mètode es basa en el blau de Coomassie [79], un colorant amb propietats hidrofòbiques que en condicions d'acidesa té un color marró obscur i quan interacciona amb l'entorn hidrofòbic d'una proteïna canvia a color blau. Aquest canvi de color pot ser mesurat amb un espectrofotòmetre a  $\lambda = 540\text{nm}$  i amb una corba patró (de 100 a 500  $\mu\text{g}$  proteïna/ml) pot determinar-se la concentració de proteïna a la mostra.

### 3.4.4 Determinació semi-quantitativa de proteïnes específiques per Western blot.

El Western blot (WB) és una tècnica que permet la detecció d'una proteïna en una barreja complexa de proteïnes utilitzant un anticòs específic contra la proteïna d'interès (anticòs primari) i un segon anticòs que detecta aquest primer

anticòs (anticòs secundari) i emet algun tipus de senyal (llum o fluorescència). La quantitat de senyal obtinguda en la detecció és proporcional a la quantitat de proteïna i la comparació entre mostres permet una determinació relativa dels nivells d'una proteïna. La detecció de l'anticòs (i per tan, de la proteïna) es pot fer per diferents mètodes. El mètode clàssic és a través d'una reacció enzimàtica quimioluminiscent on es detecta quantitat de llum. En aquesta tesi, s'ha fet servir una tècnica més moderna i sensible utilitzant una determinació fluorescent en l'espectre de l'infraroig (Odyssey®). Aquesta tècnica es divideix en quatre etapes i el protocol detallat es troba a l'annex III.

### **1. Preparació de la mostra**

La mostra de partida va ser una homogenat de proteïna de teixit cardíac o de cèl·lules H9c2. Per a poder realitzar el WB és important que la mostra estigui desnaturalitzada per la qual cosa es prepara un tampó de càrrega que s'incorpora a la mostra en proporció 3:1 (mostra:tampó) que conté  $\beta$ -mercaptoetanol per rompre ponts disulfur entre subunitats i SDS (detergent desnaturalitzant). A més aquest tampó dóna densitat (glicerol) per facilitar la càrrega de la mostra al gel, també incorpora un colorant (blau de bromofenol) per poder seguir el front de l'electroforesi i confereix un pH adient per a la correcta migració de les proteïnes. Abans de carregar la mostra, es bull durant cinc minuts per afavorir la desnaturalització.

### **2. Electroforesi SDS-PAGE**

Es basa en la separació de les proteïnes, en condicions desnaturalitzants, segons el seu pes molecular mitjançant un gel de poliacrilamida. Durant aquesta fase, les proteïnes són mobilitzades a través del gel de poliacrilamida per mitjà d'un corrent elèctric. L'SDS del buffer s'uneix de manera constant a la proteïna amb una relació aproximada d'una molècula d'SDS per cada dos aminoàcids, el que provoca que la càrrega (negativa) associada a la molècula sigui proporcional al



seu pes molecular. D'aquesta manera, la mobilitat de les proteïnes de la mostra dependrà del pes molecular. El gel de poliacrilamida confereix un suport humit per a que es produeixi la separació de les mostres i és un element important per a determinar la resolució de la separació. Segons la concentració de poliacrilamida del gel, es forma una xarxa de polímers d'acrilamida més o menys porosa que determina que es puguin separar proteïnes més grans o més petites.

### **3. Transferència**

Consisteix en la transferència i immobilització de les proteïnes del gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocel·lulosa o PVDF. La transferència es realitza mitjançant un corrent elèctric i les proteïnes queden retingudes a una membrana a la qual, després, es realitza la detecció de les proteïnes d'interès.

### **4. Detecció de proteïnes**

La detecció específica de les proteïnes d'interès es realitza mitjançant l'ús d'anticossos. Primerament la membrana s'incuba amb una solució proteica (llet en pols, BSA o, com en aquesta tesi, el *blocking buffer* de Li-Cor (Ref: 927) per evitar unions inespecífiques de l'anticòs amb la membrana. La detecció de la proteïna d'interès es realitza mitjançant un anticòs primari que detecta de forma específica la proteïna per la que ha estat dissenyat. En una segona fase, un anticòs secundari conjugat amb un fluorocrom detecta l'anticòs primari i amb un aparell d'imatge fluorescent a l'espectre de l'infraroig (en aquesta tesi el model 9120 de Li-Cor) es realitza de determinació. Els anticossos utilitzats en aquesta tesi es poden consultar a la taula 5. Les imatges obtingudes en aquesta tesi varen ser processades amb el programa informàtic *Image Studio* de Li-Cor.

Gen	kDa	Dilució	Origen	Referència
AKT	60	1:1000	ratolí	Cell signaling 2920s
AMPK	63	1:500	ratolí	Santa Cruz 74461
Caspase 3	35	1:1000	conill	Cell signaling 13038s
Cleaved caspase 3	17 o 19	1:1000	conill	Cell signaling 9662
DNP (carbonils)	-	1:300	ratolí	Merck Millipore 90451
ER $\alpha$	66	1:200	conill	Santa Cruz 542
ER $\beta$	56	1:200	ratolí	Santa Cruz 53494
ERK	42-44	1:2000	ratolí	Cell signaling 9107
GAPDH	37	1:500	ratolí	Santa Cruz 365062
GPER	42	1:200	conill	Santa Cruz 48525
HNE	-	1:500	ratolí	$\alpha$ -Diagnostics HNE11-s
OXPHOS	*	1:250	ratolí	Abcam 110413
pAKT (Thr308)	60	1:500	conill	Cell signaling 13038s
pAMPK (Thr172)	63	1:500	conill	Cell signaling 50081
pERK (Thr202/Tyr204)	42-44	1:1000	conill	Cell signaling 9101
PGC1 $\alpha$	90	1:500	conill	Santa Cruz 13067
PGC1 $\beta$	113	1:1000	conill	Abcam 176328
TFAM	25	1:1000	conill	Abcam 131607
UCP2	35 o 70	1:500	cabra	Santa Cruz 6526

**Taula 5. Anticossos primaris utilitzats durant la tesi.**

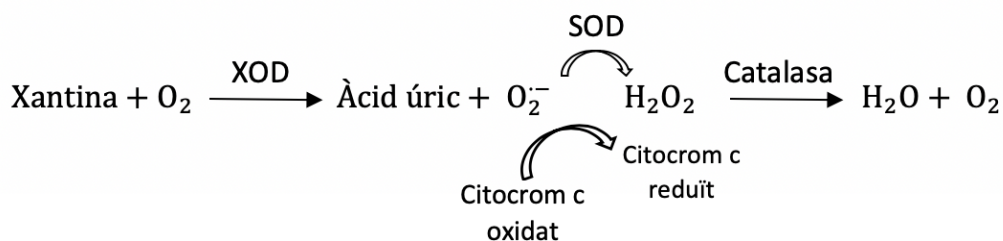
*\*OXPHOS és un combinat d'anticossos envers proteïnes dels diferents complexos de la cadena de respiratòria: NDUFB8 (CI); 20 kDa / SDHB (CII); 30 kDa / MTCO1 (CIV); 40 kDa / UQCRC2 (CIII); 48 kDa / ATP5A (CV); 55 kDa.*

### 3.4.5 Activitats enzimàtiques

#### **Activitat superòxid dismutasa (SOD)**

L'enzim superòxid dismutasa (SOD; EC 1.12.1.1) és un dels principals enzims que conformen el sistema de defensa antioxidant contra la formació d'espècies reactives d'oxigen (ROS) ja que neutralitzen l'anió superòxid el qual es genera com a subproducte dels processos que tenen lloc a la cadena respiratòria mitocondrial. L'enzim SOD catalitza la dismutació de l'anió superòxid en peròxid

d'hidrogen i oxigen molecular. La determinació de l'activitat SOD té lloc en dues reaccions acoblades. La primera reacció es basa en la reducció del citocrom c en presència de l'anió superòxid, anteriorment generat per l'enzim xantina oxidasa (XOD) en la reacció d'oxidació de la xantina. En la segona reacció, l'enzim SOD transforma l'anió superòxid en peròxid d'hidrogen, disminuint el citocrom reduït generat a la reacció anterior. Per tant, la mesura de la reducció del citocrom c, detectable a una longitud d'ona de 550 nm, serà inversament proporcional a l'activitat de l'enzim SOD [80].



L'assaig de l'activitat SOD en teixit cardíac es va realitzar en plaques de 96 pous aptes per espectrofotometria en un volum final de 250µl. Primerament, es va preparar una *mix* amb tots els reactius de la taula 6 (sense la mostra). Els reactius es varen preparar en PBS, excepte la xantina, que és insoluble en aigua, i es va preparar en NaOH 30 mM. A continuació, es varen dipositar les mostres als pous corresponents i tot seguit es va afegir la *mix* i es va introduir la placa a l'espectrofotòmetre a una temperatura de 37 °C per fer una lectura contínua a una longitud d'ona de 550 nm durant 15 minuts (Biotek, FLx800). Referències reactius: Citocrom c (Sigma, C7150), XOD (Sigma, X1875), Xantina (Sigma, X7375), Catalasa (Sigma, C1345).

	Mostra	Control
<b>PBS pH 7.4</b>	225 - X µl	225 µl
<b>Mostra</b>	4 µl *	-
<b>Citocrom C 1.95 mM</b>	6 µl	6 µl
<b>XOD 335 mU/ml</b>	9 µl	9 µl
<b>Xantina 10 mM</b>	2.5 µl	2.5 µl
<b>Catalasa 6000 U/ml</b>	2.5 µl	2.5 µl
<b>TOTAL</b>	250 µl	250 µl

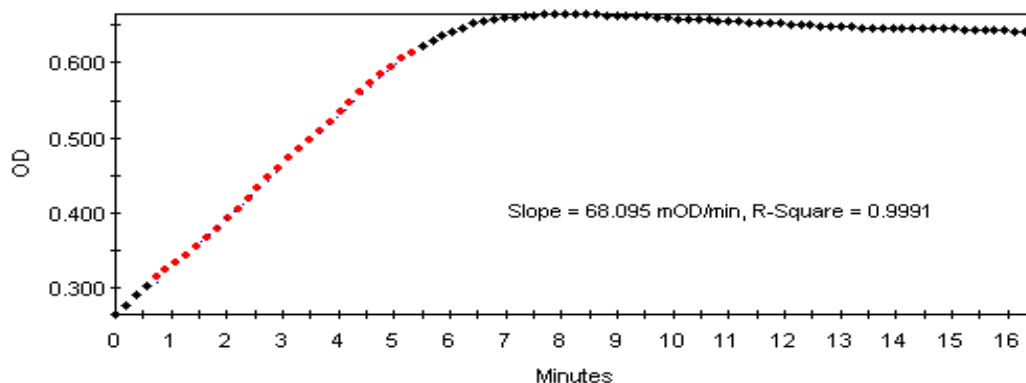
**Taula 6. Reactius per a determinar l'activitat SOD**

*\*A aquesta tesi equival a uns 1.5-2µg de proteïna de teixit cardíac i correspon a una dilució 1/20 de l'homogenat de cor (apartat 3.3.1).*

A la figura 6 es mostra un exemple d'una lectura.

**Figura 6. Exemple de la corba d'absorbància de l'activitat SOD a cor.**

*La zona en vermell indica els punts en els que es realitza la determinació del pendent.*



Els càlculs es varen realitzar aplicant la següent fórmula i les dades es varen obtenir de la part lineal del pendent (part vermella).

$$\text{Activitat SOD } ((\text{mAbs} \cdot \text{min}^{-1}) \cdot \mu\text{g prot.}^{-1}) = \frac{\text{pendent control} - \text{pendent mostra}}{\mu\text{g proteïna}}$$

**Activitat catalasa**

L'enzim catalasa (CAT; EC 1.11.1.6) és un enzim oxidoreductasa implicat en la descomposició de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generat durant el metabolisme cel·lular.

La determinació de l'activitat catalasa es basa en l'addició de peròxid d'hidrogen per iniciar la reacció. D'aquesta manera, l'enzim catalasa descompon el peròxid d'hidrogen formant aigua i oxigen. Finalment, l'addició de molibdat amònic atura la reacció formant un complex de color groc entre el peròxid d'hidrogen residual i el molibdat amònic, detectable a longitud d'ona  $\lambda = 374$  nm [81], [82]. L'aparició de color és inversament proporcional a l'activitat catalasa.

L'assaig de l'activitat catalasa en teixit cardíac es va realitzar en plaques de 96 pous aptes per espectrofotometria en un volum final de 220  $\mu$ l. Primerament, es va carregar el tampó (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 38.3mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 61.73mM; pH 7,0) i les mostres amb els volums indicats a la taula 7. A continuació, es va afegir ràpidament la solució de peròxid d'hidrogen als pous corresponents i es va incubar la placa a 37 °C durant 2 minuts. Finalment, es va aturar la reacció amb el molibdat amònic ((NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub> Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>), es va agitar per eliminar les bombolles i es va determinar l'absorbància a 374 nm (Biotek, FLx800). Referències reactius: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Panreac, 141076), Molibdat (Sigma, 277908).

	Blanc (B)	Blanc estàndard (S)	Mostra	Control (M)
<b>Tampó</b>	200 $\mu$ l	180 $\mu$ l	180 - X $\mu$ l	200 - X $\mu$ l
<b>Mostra</b>	-	-	3 $\mu$ l *	3 $\mu$ l *
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 650 mM</b>	-	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l	-
<b>Molibdat 140.72 mM</b>	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l
<b>TOTAL</b>	220 $\mu$ l	220 $\mu$ l	220 $\mu$ l	220 $\mu$ l

**Taula 7: Reactius per a determinar l'activitat catalasa**

*\*a aquesta tesi equival a uns 25-30 $\mu$ g de proteïna de teixit cardíac (apartat 3.3.1)*

Els càlculs es varen realitzar aplicant la següent fórmula:

$$\text{Act. catalasa (kU/\mu g proteïna)} = \left( \frac{2.303}{t(\text{min})} \right) * \log \left[ \frac{S}{\text{Mostra} - M} \right] * \frac{V \text{ final pouet } (\mu\text{l})}{V \text{ carregat de mostra } (\mu\text{l})} * \frac{1\mu\text{l}}{\mu\text{g proteïna}}$$

### 3.4.6 Determinació semi-quantitativa de l'expressió gènica

La determinació de l'expressió gènica es realitza en diferents passes que tenen com objectiu convertir l' RNA (resultant de l'expressió dels gens a cadenes de RNA missatger) a una cadena de DNA complementària (cDNA) que pugui ser amplificada de forma específica pel gen d'interès i que doni un senyal detectable i proporcional a la quantitat inicial de RNA per aquest gen en concret. Per últim, la comparació del senyal obtingut entre les diferents mostres permet la determinació relativa dels nivells d'expressió de gens entre mostres. Aquesta tècnica es basa en tres fases que poden consultar-se en detall al protocol V.

#### **1r. Extracció de RNA de teixits i cultius cel·lulars**

L'extracció de RNA es va realitzar mitjançant el reactiu comercial TriPure Isolation Reagent™ (Ref: Roche, 157001) seguint les instruccions del fabricant.

Breument, primerament es procedeix a lissar les cèl·lules o a homogeneïtzar el teixit dins TriPure™ (amb l'ajuda d'un homogeneïtzador en el cas del teixit). L'obtenció de RNA es basa en una extracció fenol:cloroform i un agent caotrópic com el tiocianat de guanidina. Després de la primera extracció s'obté un fase sobrenedant aquosa que conté l'RNA i una fase inferior fenòlica que conté proteïnes i DNA que poden ser separats en fases posteriors. A partir de la fase aquosa es precipita l'RNA amb isopropanol, es purifica amb etanol de 75 % i es resuspèn el pellet d'RNA en aigua lliure d'RNAases. La quantificació de l'RNA es realitza amb un espectrofotòmetre mesurant l'absorbància a 260nm. La puresa de la mostra també pot determinar-se si es compara l'absorbància a 260 nm (RNA) amb l'absorbància de certs contaminants com proteïnes (280 nm) i fenol (230 nm). Els ratis recomanats són:  $A_{260}/A_{280} > 1.9$  i  $A_{260}/A_{230} > 2.0$ .

Degut la presència de fenol, s'ha de treballar en una campana de gasos per evitar respirar els vapors i els residus han de ser degudament eliminats.

## **2n. Retro-transcripció**

La retro-transcripció consisteix en sintetitzar DNA complementari a les cadenes de RNA d'una mostra (cDNA) mitjançant una transcriptasa reversa. En aquesta tesi, la retro-transcripció es va fer seguint les indicacions del fabricant de la retro-transcriptasa del virus murí de la leucèmia M-MLV (Ref: Invitrogen, 10338842) i es va fer servir el termociclador GeneAmp 9700 (Applied Biosystems).

## **3r. PCR a temps real**

La PCR a temps real permet l'amplificació i quantificació simultània del producte amplificat a través de l'ús d'una sonda fluorescent. La PCR es du a terme mitjançant un termociclador que realitza diferents cicles de temperatura (desnaturalització, alineament i extensió) i permet l'amplificació d'un fragment de cDNA en concret mitjançant l'ús d'un encebador (*primer*) específic pel gen que es vol determinar. La seqüència de la parella d'encebadors així com la temperatura (*annealing temperature*) determinen l'especificitat de l'amplificació. A cada cicle hi ha un pas de captació de fluorescència que és proporcional al grau d'amplificació de la mostra. A majors nivells d'un transcrit a la mostra, majors nivells de cDNA corresponent durant la retro-transcripció i, per tant, major amplificació durant la PCR. El termociclador que es va fer servir a la present tesi va ser el LighCycler® 480 System II (Roche Diagnostics). A les taules 8 i 9 es poden veure els encebadors i les temperatures per a gens de rata i humans.

## **4t. Quantificació dels resultats**

La quantificació de la informació es fa en base el que s'anomenen *crossing point* (Cp). El Cp és el cicle d'amplificació en el qual la fluorescència emesa per la mostra sobrepasa un llindar predefinit (manual o automàtic) igual per totes les mostres. Com més baix sigui el Cp major és l'expressió d'un gen ja que aquest valor indica que calen menys cicles per assolir un cert grau de fluorescència.

L'eficiència de la PCR a temps real depèn del parell d'encebadors i dels tipus de mostra de partida i s'ha de tenir en compte a l'hora quantificar els resultats. El seu valor s'obté experimentalment a partir dels amplificats obtinguts després de fer una PCR. Es realitza una banc de dilucions de  $10^{-3}$  a  $10^{-9}$  i es fa una nova PCR i l'eficiència es determina a partir del pendent de la recta que s'obté representant el logaritme de la concentració enfront el  $C_p$ .

Els càlculs d'aquesta tesi es varen realitzar fent servir el programa informàtic Genex (MultiDAnalises) amb les corresponents eficiències determinades per a cada parell d'encebadors i tenint en compte l'expressió de GAPDH com a gen de referència per a normalitzar.

Gen	Encebador directe (5'- 3') Encebador revers (3'- 5')	Temperatura
AdipoR1	ATGGAGAGTCGACAGGCCTAA CGTGTCCGCTTCTGTACTA	60°C
AdipoR2	GACGGGCAACATTTGGACAC AAAGGCAGAGAATGGCTCCC	60°C
APPL1	CGTCCAGGAGGACAATCTCG GACCAAAGGCTTTTGCTGG	60°C
CD36	CTCACAACTCAGATACTGCTG TCCAAACACAGCCAGGACAG	60°C
COL1A	GGAGAGAGCATGACCGATGG GGGACTTCTTGAGGTTGCCA	60°C
COL3A	TCCCCTGGAATCTGTGAATC TGAGTCGAATTGGGGAGAAT	60°C
eNOS	TGCAACAACCGAGGCAATC CACCAGCTGGCTGTTCCAGA	60°C
ET1	TGATTCTTGCCTCTTCTTG TATGGAATCTCCTGGCTCTC	60°C
FN	CAGCCCCTGATTGGAGTC TGGGTGACACCTGAGTGAAC	60°C
GAPDH	CTG GTG GTC CAG GGG TCT TA CCA CTC CTC CAC CTT TGA CG	60°C
GLUT4	TATTTGGCT TTGTGGCCTTC CGGCAAATAGAAGGAAGACG	60°C



HIF1 $\alpha$	GCGGCGAGAACGAGAA AGATGGGAGCTCACGTTGTG	60°C
IL6	CACGGCCTTCTACTTCAC CTGCAAGTGCATCATCGTTGT	60°C
iNOS	ACCATGGAGCATCCCAAGTA CAGCGCATAACCACTTCAGC	60°C
PAI-1	TCTCTCCCTATGGCGTGTCC GGCATCCGCAGTACTGATCT	60°C
PGC1 $\alpha$	ATGTGCAGCCAAGACTCTGTA GGTCACTACACCACTTCAATCCA	60°C
PGC1 $\beta$	AAAAGGCCATCGGTGAAGGT CTCCGAACACCGGAAGGTAA	60°C
PPAR $\alpha$	TGTCGAATATGTGGGGACAA AAACGGATTGCATTGTGTGA	60°C
PPAR $\gamma$	TCAGAGGGACAAGGATTCATGA CACCAAAGGGCTTCCGCAGGCT	60°C
T-cadherina	AAGATGCAGCCGAGAACTCC CTTGTTGCCCTTGCAGTCAC	60°C
TGF $\beta$ 1	GCAACAACGCAATCTATGAC CCTGTATTCCGTCTCCTT	60°C
UCP2	CAATGTTGCCCGAAATGC TCTTGACCACATCAACGG	60°C
UCP3	GGAGGAGAGAGGAAATACAGAGG CCAAAGGCAGAGACAAAGTGA	60°C
VCAM	ACAAAACGCTCGCTCAGATT GTCCATGGTCAGAACGGACT	60°C
VEGFA	CAAGCCAAGGCGGTGAGCCA TCTGCCGAGTCTCGCCCTC	60°C

**Taula 8: Parelles d'encebadors per a gens de rata i la seva temperatura d'hibridació.**  
*Elaboració pròpia*

Gen	Encebador directe (5'- 3') Encebador revers (3'- 5')	Temperatura
COX2	CCC TTC TGC CTG ACA CCT TT TTC TGT ACT GCG GGT GGA AC	60°C
COXIV	AAC GAG TGG AAG ACG GTT GT TCA TGT CCA GCA TCC TCT TG	60°C

ER $\alpha$	AAT TCA GAT AAT CGA CGC CAG GTG TTT CAA CAT TCT CCC TCC TG	60°C
ER $\beta$	TAG TGG TCC ATC GCC AGT TAT GGG AGC CAC ACT TCA CCA T	60°C
E-selectina	AGT CCT CTT GTG CCT TCA GC TTG CAC ACA GTG CCA AAC AC	60°C
GAPDH	CTG GTG GTC CAG GGG TCT TA CCA CTC CTC CAC CTT TGA CG	60°C
GPER	TCCCCTGGAATCTGTGAATC TGAGTCGAATTGGGGAGAAT	60°C
ICAM	AAC CAG AGC CAG GAG ACA CT GGA ACC CCA TTC AGC GTC A	60°C
IL6	CAG GGG TGG TTA TTG CAT CT AGG AGA CTT GCC TGG TGA AA	60°C
MCP1	ATC ACC AGC AGC AAG TGT CC TGG GTT GTG GAG TGA GTG TT	60°C
MnSOD	CGT GCT CCC ACA CAT CAA TC TGA ACG TCA CCG AGG AGA AG	64°C
NF- $\kappa$ B	CCT GGA TGA CTC TTG GGA AA TCA GCC AGC TGT TTC ATG TC	58°C
PAI-1	TGT CAT AGT CTC AGC CCG CA TTT CCC GAT GCA TCT CCA GT	60°C
PGC1 $\alpha$	TCA GTC CTC ACT GGT GGA CA TGC TTC GTC GTC AAA AAC AG	60°C
PGC1 $\beta$	TCTCTCCCTATGGCGTGTCC GGCATCCGCAGTACTGATCT	60°C
PPAR $\gamma$	GAG CCC AAG TTT GAG TTT GC CTG TGA GGA CTC AGG GTG GT	60°C
SIR1	AAAAGGCCATCGGTGAAGGT CTCCGAACACCGGAAGGTAA	60°C
SIRT3	CGG CTC TAC ACG CAG AAC ATC CAG AGG CTC CCC AAA GAA CAC	56°C
TFAM	GTG GTT TTC ATC TGT CTT GGC ACT CCG CCC TAT AAG CAT CTT G	60°C

**Taula 9: Parelles d'encebadors per a gens humans i la seva temperatura d'hibridació.**  
*Elaboració pròpia*

### 3.5 Anàlisi estadística

Per a l'anàlisi estadística es va fer servir el programa informàtic Prism 8 (GraphPad).

#### ***Anàlisis estadística dels resultats in vivo***

Les dades s'expressen com a mitjana  $\pm$  error estàndard de 8 animals per grup. Les diferències entre els grups LEAN (fa/+) i SHAM (fa/fa) varen ser analitzades mitjançant un test *t* d'Student amb un interval de confiança del 95 %. Les diferències entre els grups SHAM, OVA i OVA+E2 (fa/fa) varen ser analitzades mitjançant una anàlisi de variància (One-way ANOVA) amb un nivell de confiança del 95 %, considerant-se significatives si el *valor-p* era inferior a 0,05 ( $p < 0,05$ ). Posteriorment, les diferències entre grups varen ser analitzades amb el test *post-hoc* LSD de Fisher. En les determinacions del pes i la glucèmia durant 15 setmanes les diferències varen ser analitzades mitjançant una anàlisi de variància de dos factors (Two-way ANOVA: hormones i edat) amb un nivell de confiança del 95 %, considerant-se significatives si el *valor-p* era inferior a 0,05 ( $p < 0,05$ ). Posteriorment, les diferències entre grups varen ser analitzades amb el test *post-hoc* LSD de Fisher.

#### ***Anàlisis estadística dels resultats in vitro***

Les dades s'expressen com a mitjana  $\pm$  error estàndard de 2 experiments realitzats per triplicat ( $n=6$ ). Per a la comparació més senzilla entre dos grups (C vs. E2) varen ser analitzades mitjançant un test *t* de Student amb un interval de confiança del 95%, considerant-se com diferències significatives si el *valor-p* era inferior a 0,05 ( $p < 0,05$ ). Les diferències entre diferents tractaments (quan eren més de 2 grups diferents) varen ser analitzades mitjançant una anàlisi de variància (One-way ANOVA) amb un nivell de confiança del 95 %, considerant-se significatives si el *valor-p* era inferior a 0,05 ( $p < 0,05$ ). En el cas d'incorporar una

segona variable com el temps o en el cas d'analitzar l'efecte de l'E2 en condicions de lipotoxicitat (H9c2) o de glucolipotoxicitat (HUVEC) les diferències varen ser analitzades mitjançant una anàlisi de variància de dos factors (Two-way ANOVA) amb un nivell de confiança del 95 %, considerant-se significatives si el *valor-p* era inferior a 0,05 ( $p < 0,05$ ). Posteriorment, en els dos tipus d'anàlisi de variància ANOVA utilitzats, les diferències entre grups varen ser analitzades amb el test *post-hoc* LSD de Fisher.

### 3.6 Protocols

## I. Protocol de l'ovariectomia, la implantació de la mini-bomba osmòtica i la cirurgia simulada

*Tot els procediments es faran seguint la màxima asèpsia possible. Tot el material serà estèril d'un sol ús o bé estarà degudament esterilitzat (autoclau o filtració).*

*El personal manipularà els animals amb mascareta, gorra de cirurgia, guants i bata de fibra d'un sol ús. Les superfícies de treball s'hauran netejat primer amb aigua i sabó i finalment amb etanol.*

### Material necessari:

- Bisturí nº20
- Meloxicam (CN: 432070)
- Sutura absorbible: Polysorb™ 3/0 o 4/0
- Ketamina (CN: 454023)
- Sutura seda trencada: Aragó 2/0
- Xilacina (CN: 425032)
- Solució fisiològica estèril
- Lipolac (CN: 764118)

### A. Procediment quirúrgic de l'ovariectomia i la implantació de la mini-bomba

1. Pesar la rata.
2. Calcular la dosi de preanalgesia i d'anestèsia segons la taula.

Fàrmac	Presentació	Dosi	Factor
Meloxicam	2 mg/ml	2 mg/kg	Pes (g) x 0,001
Ketamina	100 mg/ml	90 mg/kg	Pes (g) x 0,0009
Xilacina	20 mg/ml	10 mg/kg	Pes (g) x 0,0005

3. Administrar, per via subcutània, la preanalgesia (Meloxicam).
4. Administrar, per via intraperitoneal, l'anestèsia (Ketamina+Xilacina)
5. Comprovar l'efecte de l'anestèsia amb el reflexe podal i el reflexe ocular.
6. Protegir els ulls de la dessecació amb un gel ocular (Lipolac).
7. Rasurar del pel de l'abdomen i de la zona cervical.
8. Assegurar la rata sobre la manta tèrmica (40°C).
9. Aplicar alcohol 75% a la zona abdominal.

10. Posar el camp quirúrgic sobre la zona abdominal.
11. Iniciar la cirurgia amb un tall longitudinal (1,5 cm) a l'altura de la tercera glàndula mamària amb un bisturí.
12. Amb l'ajuda d'unes pinces separar la pell del múscul i tallar el múscul abdominal per la línia alba.
13. Per trobar els ovaris, cercar els corns uterins (un a cada lateral).
14. Estirar, suaument, el corn uterí fins a exposar l'ovari.
15. Previ a la resecció de l'ovari, s'elimina el teixit adipós periovàric. Es fa la lligadura per la trompa (entre l'ovari i l'inici del corn uterí) amb una sutura re-absorbible i es procedeix a tallar amb les tisores per sobre de la sutura.
16. Es retorna, amb cura, el corn uterí al seu lloc.
17. Repetir els punts 13, 14 i 15 per l'altre ovari.
18. Per finalitzar es procedeix al tancament de les incisions per plànols. Les sutures del múscul es fan amb sutura contínua re-absorbible, les sutures de la pell es fan amb sutura discontinua.
19. Netejar les restes de sang amb solució fisiològica estèril i posar una garsa a sobre de la ferida.
20. Donar la volta a l'animal i netejar amb alcohol 75% la zona cervical.
21. Realitzar una incisió a la zona interescapular (1,5cm) perpendicular a la columna vertebral fins arribar al múscul.
22. Amb unes pinces estèrils, separar la pell del múscul per fer una cavitat on dipositar la mini-bomba (amb el tractament adient).
23. Introduir la mini-bomba (primer la part del tap blanc) i suturar la pell.
24. Es retorna l'animal a la seva gàbia amb una font de calor fins que es recuperi de l'anestèsia.
25. Observar l'animal durant els dies posteriors a la intervenció i repetir la dosi d'analgèsia a les 24 i 48 hores.

## **B. Procediment quirúrgic de les cirurgies simulades**

Es segueix el mateix protocol que per les cirurgies però amb les següents diferències:

-Una vegada localitzats els corns uterins, els ovaris es treuen a l'exterior de la cavitat abdominal i es tornen a introduir sense realitzar cap tipus d'intervenció.

-Després de la realització de la incisió a la zona cervical, es forma la cavitat però no es posa cap mini-bomba i es procedeix a suturar la incisió amb normalitat.

## II. Protocol del manteniment de les cèl·lules H9c2 i HUVEC

### A. Manteniment rutinari:

<p><b>Condicions incubador:</b> 37 °C i 5 % CO<sub>2</sub></p>
<p><b>Medi de cultiu complet:</b> DMEM <i>High Glucose</i> (Biowest, L0107) o F12-K (ATCC, 30-2005) +10% de sèrum fetal boví (FBS) (Biological industries, ref: S181B) +Penicil·lina 100 U/ml (Biological Industries, ref: 03-031) +Streptomycina 0.1 mg/ml (Biological Industries, ref: 03-031)</p>

Els **subcultius** es realitzen quan les cèl·lules arriben a una confluència del 70-80%. El procediment per a fer un subcultiu amb un rati 1:2 (per exemple) per a una placa de 55 cm<sup>2</sup> és el següent:

- 1- Aspirar el medi i rentar amb 2 ml de PBS.
- 2- Posar 1,5 ml de tripsina-EDTA (tripsina 0.25% i EDTA 0.02%)
- 3- Incubar 5 minuts a 37°C.
- 4- Afegir 4,5 ml de medi complet per inactivar la tripsina, transferir a un tub estèril de 50ml i completar amb medi complet fins a 20 ml.
- 5- Sembrar 10 ml de la suspensió de cèl·lules a dues plaques p100 noves.

### B. Congelació de cèl·lules:

- 1- Seguir els passos 1-4 de l'apartat A.
- 2- Traspasar la suspensió cel·lular a un tub estèril de 15 ml.
- 3- Centrifugar a 300g durant 5 minuts.
- 4- Re-suspendre el pellet cel·lular amb 1 ml de medi complet amb un 5% de dimetilsulfòxid (DMSO).
- 5- Traspasar la suspensió a un criovial i emmagatzemar a -80°C dins un tanc de congelació Mr. Frosty™ (Thermofisher) amb isopropanol.
- 6- A les 4 hores es poden passar a un tanc amb nitrogen.

### C. Descongelació de cèl·lules:

- 1- Posar el vial en un bany a 37°C.
- 2- Afegir petits volums de medi complet al vial i recollir la suspensió.
- 3- Centrifugar la suspensió a 300g durant 5 minuts.
- 4- Re-suspendre el pellet cel·lular amb 4,5 ml de medi complet.
- 5- Recomptar el numero de cèl·lules
- 6- Transferir a una placa (p60 per a H9c2 i p100 per a HUVEC).

### III. Protocol de la quantificació relativa de proteïnes per Western blot

#### A. Obtenció de proteïna

*S'ha de realitzar tot el procés en gel per evitar la degradació de les proteïnes.*

##### **Per a mostres de teixit cardíac**

- 1- Dipositar 100 mg de teixit en un tub de 2 ml que contengui 1 ml de tampó STE amb el còctel d'inhibidors de proteases i fosfatases HALT (2x) i homogeneïtzar amb un Politró enèrgicament.
- 2- Sonicar dues vegades la mostra amb una potència de 20W durant 10 segons.
- 3- Centrifugar la mostra a 500 g durant 10 minuts (4 °C) i recollir el sobrenedant.

*Composició tampó STE:* Tris 20 mM, sacarosa 250 mM, EGTA 2 mM i KCl 40 mM; pH 7.4.

*Composició còctel HALT 100x (Ref: Thermo™ 78439):* Aprotinina, bestatina, E-64, leupeptin, Fluorur sòdic, ortovanadat sòdic, pirofostat sòdic i  $\beta$ -glicerofosfat.

##### **Per a cèl·lules H9c2 (cultivades en placa de 6 pous)**

- 1- Aspirar el medi de cultiu i retirar les restes de medi i tractaments amb un rentat amb PBS (1-2 ml).
- 2- Posar la placa de cultiu sobre una superfície freda i dispensar 100-120  $\mu$ l de tampó RIPA i HALT (1x) i lisar les cèl·lules amb l'ajuda d'un *scraper*.
- 3- Transferir el contingut a un tub de 1,5 ml i centrifugar a 10.000g durant 10 minuts (4°C).

*Composició tampó RIPA:* Tris 50 mM pH 7.5, Tritó X-100 0.1%, deoxicolat sòdic 0.5%, SDS 0.1% i EDTA 1 mM.

#### B. Quantificació de proteïna per BCA

*El protocol que es segueix és el recomanat per la casa comercial.*

- 1- Preparar la solució de treball (WR) a partir dels reactius A i B en proporció 50:1. Es necessiten 260  $\mu$ l per cada mostra (més el patró i el blanc).
- 2- A una placa transparent per espectrofotometria de 96 pous, dipositar 9  $\mu$ l de la mostra (H9c2: directe, cor: dilució prèvia 1/20) i el patró (per duplicat) a cada pou.
- 3- Afegir 260  $\mu$ l de la WR a cada pou, agitar suaument i incubar a 37 °C durant 30 minuts.
- 4- Llegir l'absorbància de les mostres i el patró a 562nm (PowerWave XS, Bio-tek).
- 5- Calcular la recta de regressió del patró i determinar la concentració de la mostra.



## C. Electroforesis

### Preparació de la mostra

- 1- Agafar un volum corresponent a 10-50 µg de proteïna de cada mostra i transferir-lo a un tub de 1,5 ml.
- 2- Completar amb RIPA/STE fins a tenir un volum final igual a totes les mostres.
- 3- Afegir *sample buffer* a relació 3:1 (mostra:buffer). *El sample buffer no està preparat del tot, fa falta afegir-li un 10 % de B-mercaptoetanol.*
- 4- Punxar el tap dels tubs amb una agulla
- 5- Bullir les mostres 5 minuts.
- 6- Carregar les mostres i el *marker* als pouets del gels.

*Composició del sample buffer:* Tris 0.25M, SDS 10%, glicerol 40%, blau de bromofenol 0.1%; pH 6.8.

### Preparació dels gels

Nº de pous	Gruix de la pinta		
	0,75mm	1 mm	1,5mm
10	33µl	44µl	66µl
15	20µl	26µl	40µl

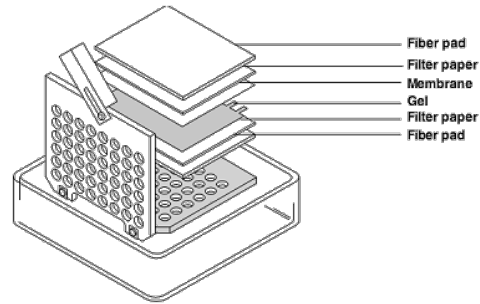
*Volum màxim per pou segons nº de pous i el gruix de la pinta.*

- 1- Netejar amb alcohol de 75% els vidres i les pintes necessàries.
- 2- Montar els suports.
- 3- Preparar el *resolving gel* de poliacrilamida a la concentració adequada.  
*El TEMED i el PSA 10% inicien la polimerització del gel, per tant, es posen just abans d'emplenar els suports.*
- 4- Vertir el *resolving gel* (3/4 parts dels vidres) i completar (1/4) amb aigua.
- 5- Esperar a que polimeritzi.
- 6- Eliminar l'aigua dels suports per volcat i assecar amb paper de filtre.
- 7- Preparar l'*stacking gel* (5%), completar el gels i col·locar les pintes.
- 8- Esperar a que polimeritzi.
- 9- Montar els gels a les cubetes d'electroforesis.
- 10- Posar tampó d'electroforesis dins els suports i observar que no perdin líquid.
- 11- Carregar els gels amb les mostres i el marcador (5µl) i completar el volum de la cubeta amb més tampó d'electroforesis.
- 12- Condicions d'electroforesis (Biorad, Mini PROTEAN®): 10 min a 50V + 2h a 100V.

*Composició del tampó d'electroforesis:* Tris 25 mM, glicina 192 mM; pH 8.3 i SDS 0.1%.

## D. Transferència

- 1- Preparar el “sandwich” amb el gel i la membrana de nitrocel·lulosa.
- 2- Posar el “sandwich” al suport seguint els colors (negre amb negre).
- 3- Posar un bloc de gel a la cubeta i un agitador magnètic.
- 4- Omplir la cubeta (1 L) amb tampó de transferència fred (4 °C)
- 5- Posar la cubeta dins un recipient amb gel i a sobre d'un agitador magnètic.
- 6- Condicions de la transferència (Biorad, Mini Trans-Blot®) : 90 min a 100 V.



*Composició del tampó de transferència:* Tris 25 mM, glicina 192 mM; pH 8.3 i metanol 20 %.

## E. Bloqueig

- 1- Bloquejar, a temperatura ambient, durant 60 minuts la membrana amb la solució de bloqueig de Li-Cor (TBS) en agitació.
- 2- Fer tres rentats de 5 minuts amb tampó TBS amb Tween 20 al 0,1 %.

## F. Inmunodetecció

### **Anticòs primari**

*Els anticòs primaris es preparen dins bloqueig de Li-Cor amb Tween 20 al 0,2 %. Es poden guardar a 4 °C i a -20 °C i són reutilitzables.*

- 1- Incubar la membrana *overnight*, a 4°C i en agitació, amb l'anticòs primari.
- 2- Fer tres rentats de 5 minuts amb tampó TBS amb Tween 20 al 0,1 %.

### **Anticòs secundari**

*Els anticòs secundaris es preparen dins bloqueig de Li-Cor amb Tween 20 al 0,2 %. Es poden guardar a 4°C (duren aproximadament un mes) i a -20 °C.*

- 1- Incubar la membrana, a temperatura ambient i en agitació, durant 1h amb l'anticòs secundari.
- 2- Fer tres rentats de 5 minuts amb tampó TBS amb Tween 20 al 0,1 %.

### **Detecció fluorescent**

La detecció de les bandes es realitza amb l'aparell Odyssey (model 9120 de Li-Cor) i permet detectar anticòs fluorescents que emetin a 680 i 800 nm.

## IV. Protocol d'aïllament mitocondrial a cor i determinació del consum d'oxigen (Oxygraph®)

### A. Aïllament mitocondrial

*Es recomana realitzar tot el procés ràpidament i en gel per evitar la degradació dels mitocondris. És important que el material no tingui restes de sabó i els reactius no contenguin sodi.*

#### **Per a mostres de teixit cardíac**

- 1- Dipositar 100 mg de teixit (fresc) en un tub d'assaig (uns 5 ml) que contengui 2 ml de tampó d'aïllament fred.
- 2- Suaument (velocitat 3-4) homogeneïtzar el teixit amb un Politró.
- 3- Passar l'homogenat a un tub de 15 ml.
- 4- Centrifugar la mostra a 500 g durant 10 minuts (4 °C).
- 5- Recollir el sobrenedant en un tub de 2ml.
- 6- Centrifugar a 8000 g durant 10 minuts (4 °C).
- 7- Descartar el sobrenedant i netejar el *pellet* amb 1 ml de tampó d'aïllament.
- 8- Centrifugar a 8000 g durant 10 minuts (4 °C).
- 9- Descartar el sobrenedant i re-suspendre el *pellet* amb 1ml de tampó d'aïllament.
- 10- Determinar la concentració de proteïna mitocondrial de les mostres per Bradford: Diluir (1/20) una fracció de la mostra (2 µl) en aigua destil·lada (38 µl).

*Guardar els mitocondris en el tampó d'aïllament en aigua-gel fins el moment de la seva utilització.*

*Composició tampó aïllament mitocondrial: Manitol 220 mM, Sucrosa 70 mM, EDTA(K<sup>+</sup>) 1 mM, Tris-HCl 10 mM, BSA (free fatty acid) 0,1 %; pH 7.4 (ajustar amb HCl o KOH).*

### B. Determinació del consum d'oxigen (Oxygraph®)

*El consum d'oxigen es realitza dins una cambra aïllada acoblada a un elèctrode de Clark. La determinació es realitza amb mitocondris aïllats en un tampó de respiració i amb l'adició de substrats i inhibidors de la cadena respiratòria.*

#### **Condicions per a mostres de teixit cardíac:**

- Volum de treball: 500 µl
- Velocitat agitador magnètic: 10
- Temperatura de treball 37 °C

*Composició tampó respiració: KCl 115 mM, HEPES 3 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM, MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 2 mM, EGTA(K<sup>+</sup>) 1 mM, BSA (free fatty acid) 0,1 %; pH 7.2 (ajustar amb HCl o KOH).*

- 1- Dipositar el volum corresponent a 100 µg de proteïna mitocondrial a la cambra i completar amb tampó de respiració fins a 500 µl.
- 2- Deixar que la lectura de la concentració d'oxigen a la cambra s'estabilitzi.
- 3- Afegir els substrats i inhibidors a la cambra de reacció, seguint l'ordre de la següent taula i deixant un espai de temps entre ells d'uns 5 minuts.

<b>Ordre</b>	<b>Reactiu</b>	<b>Volum (µl)</b>	<b>Concentració a la cambra</b>	<b>Referència</b>
1 <sup>r</sup>	<b>Succinat 50 mM</b>	50	5 mM	Sigma, S2378
2 <sup>n</sup>	<b>ADP 25 mM</b>	10	0,5 mM	Sigma, 01905
3 <sup>r</sup>	<b>Oligomicina 100 µM</b>	10	2 µM	Sigma, O4876
4 <sup>t</sup>	<b>FCCP 100 µM</b>	20	4 µM	Sigma, C2920
5 <sup>è</sup>	<b>Antimicina / Rotenona 1 mM</b>	2	4 µM	Sigma, A8674 Sigma, R8875

- 4- Els càlculs es realitzen a partir dels pendents obtinguts amb els diferents reactius.

## V. Protocol de la quantificació relativa de l'expressió gènica per PCR

### A. Obtenció de RNA

#### *Per a mostres de teixit cardíac i aorta*

1. Dipositar el teixit en un tub de 2 ml  
*Cor: 100 mg. Aorta: tota l'aorta (60 mg aprox.).*
2. Afegir 1 ml de Tripure i homogeneïtzar completament el teixit amb l'ajuda d'un Politró. Reposar 15 minuts.

#### *Per a mostres de H9c2 o HUVEV*

1. Afegir 1 ml de Tripure dins cada pou (de la placa de 6 pous) i barrejar completament amb les cèl·lules amb la punta una pipeta. Reposar 15 minuts.
2. Centrifugar a 12.000 g, 10 minuts a 4 °C per clarificar l'homogenat (només amb teixits).
3. Passar el sobrenedant a un nou tub de 2 ml (només amb teixits).
4. Afegir 0.2 ml de cloroform i agitar durant 15 segons. Reposar 15 minuts.
5. Centrifugar a 12.000 g, 15 minuts a 4 °C.
6. Recollir ± 500 µl del sobrenedant per continuar l'extracció de RNA en un nou tub.  
*La fase orgànica inferior i la interfase es poden mantenir a 4 °C per extreure DNA i proteïna posteriorment.*
7. Afegir 0.5 ml d'isopropanol i agitar durant 15 segons. Reposar 10 minuts.
8. Centrifugar a 12.000 g, 10 minuts a 4 °C.
9. Descartar el sobrenedant i afegir 1 ml d'etanol al 75 % al *pellet* d'RNA del tub.
10. Guardar a -20°C durant una nit.
11. Centrifugar a 7.500 g, 5 minuts a 4 °C.
12. Descartar el sobrenedant rentar el *pellet* amb 1ml d'etanol 75%.
13. Centrifugar a 7.500 g, 5 minuts a 4 °C.
14. Descartar el sobrenedant i assecar les restes d'etanol. Pot fer-se: a l'aire, al buit sense rotació o amb calor (a uns 50 °C).
15. Re-suspendre el *pellet* en aigua lliure de RNAases (@) (uns 20 µl) i reposar a uns 50-60 °C durant uns 10 minuts.
16. Quantificar la concentració de RNA a la mostra i determinar la puresa al Nanodrop.
17. Ajustar la mostra amb aigua @ per a una concentració de RNA aproximada de 500-700 ng/µl.
18. Guardar a -20 °C.

### B. Retro-transcripció

*Els volums de les taules corresponen a una mostra. S'ha de preparar el volum necessari adequat a les mostres que es tinguin més un control de RT que tindrà aigua @ enlloc de mostra.*

1. Preparar una **mix A** que contengui els següents reactius:

	Concentració	Volum ( $\mu\text{l}$ )	Referència
Random hexamer	50 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{l}$	Invitrogen, N8080127
dNTP mix	10 mM	1 $\mu\text{l}$	Invitrogen, 10297018
Aigua @	-	6 $\mu\text{l}$	Sigma W4502
<b>TOTAL</b>		8 $\mu\text{l}$	

2. Posar en tubs de 0.2ml el volum de mostra corresponent a 1 $\mu\text{g}$  de RNA i completar amb aigua @ fins a 4  $\mu\text{l}$ .
3. Afegir 8  $\mu\text{l}$  de la **mix A** cada un dels tubs.
4. Al termociclador; 65  $^{\circ}\text{C}$  durant 5 minuts + 4  $^{\circ}\text{C}$   $\infty$
5. Preparar una **mix B** amb els següents reactius:

	Concentració	Volum ( $\mu\text{l}$ )	Referència
First-strand Buffer	5x	4 $\mu\text{l}$	Invitrogen, 10338842
DTT	0.1 M	2 $\mu\text{l}$	Invitrogen, 10338842
Inhibidor RNAases	20 U/ $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$	AppliedB., N8080119
M-MLV	200 U/ $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$	Invitrogen, 10338842
<b>TOTAL</b>		8 $\mu\text{l}$	

6. Al termociclador; 25  $^{\circ}\text{C}$  10 minuts + 37  $^{\circ}\text{C}$  50 minuts + 70  $^{\circ}\text{C}$  15 minuts + 4  $^{\circ}\text{C}$   $\infty$
7. Fer una dilució 1/10 del producte de RT afegint 180  $\mu\text{l}$  d'aigua @ a cada mostra.

### C. PCR a temps real

*Els volums de les taules corresponen a una mostra. S'ha de preparar el volum necessari adequat a les mostres que es tinguin més el control de la RT i un blanc de PCR que tindrà aigua @.*

1. Preparar una **mix C** que contengui els següents reactius:

	Concentració	Volum ( $\mu\text{l}$ )	Referència
Aigua @	-	2.1 $\mu\text{l}$	Sigma W4502
Primer F 1/10	10 $\mu\text{M}$	0.2 $\mu\text{l}$	IDT, DNA Oligo
Primer R 1/10	10 $\mu\text{M}$	0.2 $\mu\text{l}$	IDT, DNA Oligo
SYBR <sup>®</sup> Premix Ex Taq <sup>™</sup>	2X	5 $\mu\text{l}$	Takara, RR420Q
<b>TOTAL</b>		7.5 $\mu\text{l}$	

2. Dipositar la placa de PCR en un suport refredat i carregar, a cada pou, 2.5  $\mu\text{l}$  del cDNA obtingut a l'apartat B.7 (mostres i control de RT) i 2.5  $\mu\text{l}$  d'aigua @ per fer el blanc de PCR.
3. Afegir 7.5  $\mu\text{l}$  de la mix C a cada un dels pous.
4. Tapar la placa amb film autoadhesiu i centrifugar lleugerament.

5. Realitzar la PCR seguint el següent protocol de temps i temperatures:

	Denature		PCR		Melting	Cooling
<b>Cicles</b>	1		40-45		1	1
<b>Temps</b>	5 min	10 s	10 s	12 s	5 s/1 min/-	10 s
<b>Temp.</b>	95 °C	95 °C	60 °C*	72 °C	95°C/65°C/97°C	40 °C
<b>Anàlisi</b>	-	Quantificació fluorescència			Corbes <i>melting</i>	-

*\*Aquesta temperatura depèn dels encebadors, que en aquesta tesi es van dissenyar per poder fer la PCR a 60°C.*





## **4. Resultats i discussió**

## **4.1 Efectes de les hormones sexuals femenines en l'homeòstasi cardiovascular en un model murí de diabetis**

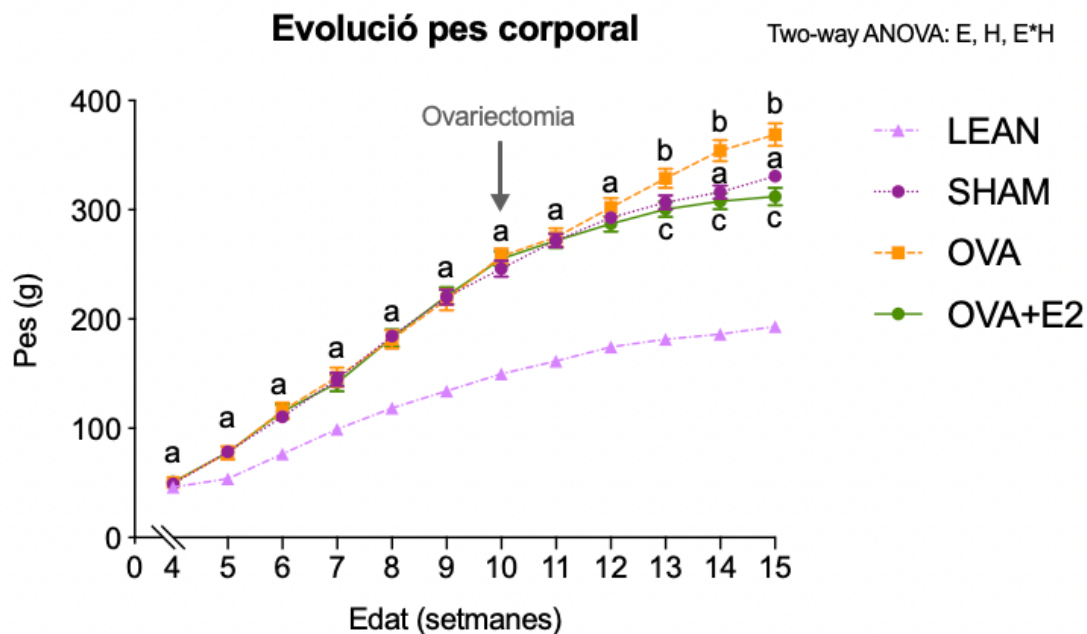
L'objectiu del present estudi ha estat analitzar l'efecte de les hormones sexuals femenines, i en concret l'estradiol, sobre marcadors de risc cardiovascular i l'homeòstasi cardíaca en una situació de diabetis i d'obesitat preestablerta. Els presents resultats es varen obtenir a rates femella ZDF que, degut a una mutació en homozigosi del gen del receptor de la leptina (fa/fa), desenvolupen un fenotip d'obesitat i diabetis quan són alimentades amb una dieta hiperlipídica. Es varen utilitzar 4 grups experimentals: rates ZDF ovariectomitzades (OVA), rates ZDF ovariectomitzades i tractades amb  $17\beta$ -estradiol (OVA+E2) i rates ZDF amb ovariectomia simulada com a grup control ZDF (SHAM). El quart grup experimental va consistir en un grup de rates control del propi model de síndrome metabòlica que no varen desenvolupar obesitat ni diabetis (LEAN). Aquestes rates també eren de la soca ZDF però tenien la mutació del gen de la leptina en heterozigosi (fa/+) i varen ser alimentades amb dieta estàndard.

### **4.1.1 Resultats**

#### **Validació del model ZDF (fa/fa) i control de qualitat de l'ovariectomia i el tractament amb E2**

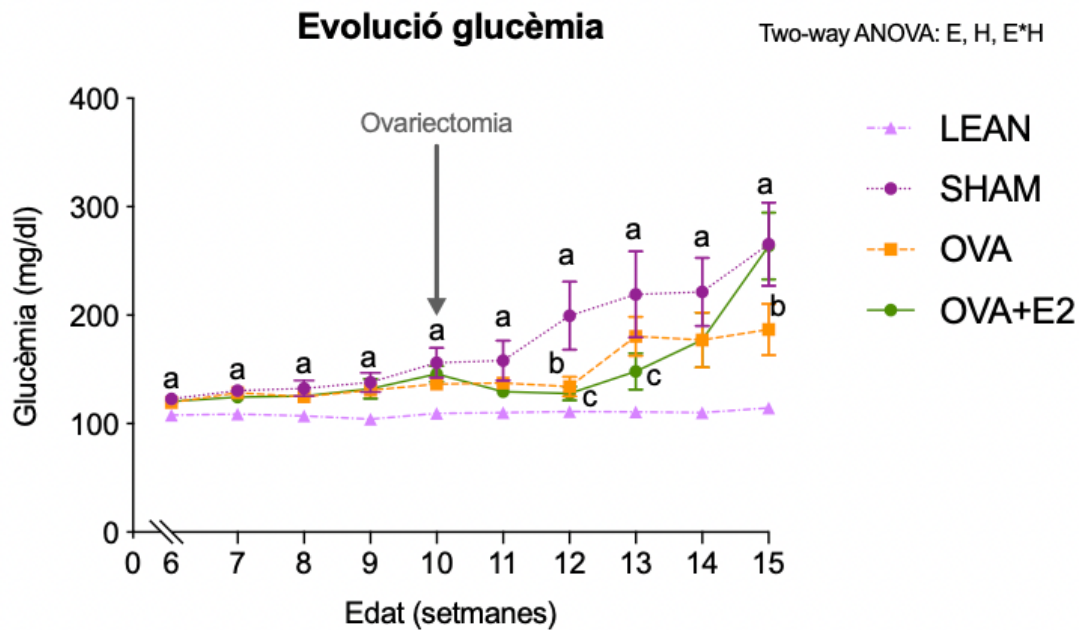
Primerament es va comprovar la idoneïtat del model d'obesitat i diabetis a través de la comparació del grup SHAM (fa/fa) amb el grup LEAN (fa/+). Vàrem observar que les rates del grup SHAM presentaven una major ingesta acumulada (calculada com una estimació de Kcal consumides durant les 15 setmanes), pes corporal i pesos dels teixits adiposos (taula 10). També es va corroborar que les rates SHAM, respecte a les rates control LEAN, mantienien una glucèmia en dejuni superior, tenien una menor tolerància a una càrrega oral de glucosa (OGTT), així com, una menor sensibilitat a la insulina (ITT) (figura 9).

De forma habitual, es determina el pes de l'úter per comprovar que l'ovariectomia es realitza de forma correcta. L'escissió quirúrgica dels ovaris redueix la producció d'hormones ovàriques, principalment d'E2, i a conseqüència es produeix l'atrofia de l'úter [64], [83], [84]. Els nostres resultats indiquen que totes les rates sotmeses a l'ovariectomia varen mostrar una important reducció del pes de l'úter (taula 10). Igualment, les rates tractades amb E2, varen mostrar un pes de l'úter similar a les rates SHAM el que, de forma indirecta, també és indicatiu del correcte funcionament de sistema d'alliberació de l'E2. A més, amb el seguiment setmanal del pes i la glucèmia s'observa clarament l'efecte de l'ovariectomia i el tractament amb E2 ja que, entre 2 i 3 setmanes després, comencen a aparèixer diferències entre els diferents grups de rates diabètiques (figures 7 i 8).



**Figura 7. Efecte de l'ovariectomia i l'administració d'E2 sobre l'evolució del pes corporal a rates femella ZDF.**

LEAN, rates control sanes; SHAM, rates ZDF sotmeses a cirurgia simulada; OVA, rates ZDF ovariectomitzades; OVA+E2, rates ZDF ovariectomitzades tractades amb  $17\beta$ -estradiol. Els valors s'expressen com la mitjana  $\pm$  error estàndard de 8 animals per grup. T-Student ( $p < 0,05$ ) a, SHAM vs. LEAN. Two-way ANOVA ( $p < 0,05$ ): E, efecte edat; H, efecte hormonal; E\*H, efecte interactiu. Test post-hoc LSD de Fisher ( $p < 0,05$ ): b, diferències vs. SHAM; c, diferències vs. OVA.



**Figura 8. Efecte de l'ovariectomia i l'administració d'E2 sobre l'evolució de la glucèmia a rates femella ZDF.**

LEAN, rates control sanes; SHAM, rates ZDF sotmeses a cirurgia simulada; OVA, rates ZDF ovariectomitzades; OVA+E2, rates ZDF ovariectomitzades tractades amb  $17\beta$ -estradiol. Els valors s'expressen com la mitjana  $\pm$  error estàndard de 8 animals per grup. T-Student ( $p < 0,05$ ) a, SHAM vs. LEAN. Two-way ANOVA ( $p < 0,05$ ): E, efecte edat; H, efecte hormonal; E\*H, efecte interactiu. Test post-hoc LSD de Fisher ( $p < 0,05$ ): b, diferències vs. SHAM; c, diferències vs. OVA.

### Efecte de l'ovariectomia i l'administració d'E2 sobre la ingesta, el pes corporal i el pes dels teixits

Com s'observa a la taula 10, l'ovariectomia no va modificar la ingesta, no obstant això, la suplementació amb E2 la va disminuir significativament respecte les rates SHAM i les OVA. Pel que fa al pes corporal, es va observar un increment en les rates ovariectomitzades que va disminuir de forma significativa amb la suplementació amb E2. Tenint en compte que a les 10 setmanes (moment en el que es realitza l'ovariectomia i s'inicia el tractament amb E2 en el grup corresponent) tenien el mateix pes, les diferències en l'evolució durant les últimes 5 setmanes ens permet avaluar millor i destacar els efectes produïts pels tractaments en aquest paràmetre (figura 7). El teixit adipós blanc visceral (TAB visceral) es compon de diferents dipòsits situats a la cavitat abdominal (gonadal, perirenal, mesentèric, retroperitoneal i periovàric). L'anàlisi dels pesos del TAB

visceral (taula 10) mostra que les rates OVA presentaren un major pes respecte al grup SHAM, però, curiosament, l'adipositat (calculada com TAB visceral (g) / pes corporal (g) x 100) d'ambdós grups va ser similar, la qual cosa indica que l'increment del pes corporal de les rates OVA respecte les rates SHAM no es podria atribuir exclusivament a l'increment del TAB visceral. Per altra banda, el tractament amb E2 va provocar una disminució del pes del TAB visceral que va anar acompanyada d'una reducció de l'adipositat en comparació als grups SHAM i OVA.

	LEAN	SHAM	OVA	OVA+E2	ANOVA
Ingesta acumulada (Kcal)	1313,1 ± 28,4	2539,3 ± 94,2 <sup>a</sup>	2651,7 ± 42,9	2308,3 ± 89,2 <sup>b,c</sup>	H
Pes corporal (g)	193,6 ± 3,6	330,8 ± 5,7 <sup>a</sup>	368,6 ± 10,6 <sup>b</sup>	311,8 ± 8,1 <sup>c</sup>	H
Δpes (g) (setmanes 10 a 15)	44,7 ± 1,9	83,7 ± 5,5 <sup>a</sup>	111,2 ± 6,1 <sup>b</sup>	56,9 ± 4,2 <sup>b,c</sup>	H
TAB visceral (g)	4,01 ± 0,42	33,91 ± 1,14 <sup>a</sup>	39,23 ± 2,09 <sup>b</sup>	26,17 ± 1,22 <sup>b,c</sup>	H
Adipositat (%)	2,14 ± 0,22	9,37 ± 0,21 <sup>a</sup>	10,04 ± 0,36	7,83 ± 0,21 <sup>b,c</sup>	H
Pes cor (g)	0,75 ± 0,06	1,00 ± 0,12	0,97 ± 0,06	0,94 ± 0,08	NS
Triglicèrids (mg/g) (teixit cardíac)	8,89 ± 0,38	12,06 ± 1,21 <sup>a</sup>	12,06 ± 1,63	11,13 ± 1,67	NS
Pes úter (g)	0,43 ± 0,10	0,37 ± 0,12	0,12 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,38 ± 0,07 <sup>c</sup>	H

**Taula 10. Efecte de l'ovariectomia i l'administració d'E2 sobre la ingesta, el pes corporal, el pes de teixits i l'índex d'adipositat a rates femella ZDF.**

LEAN, rates control sanes; SHAM, rates ZDF sotmeses a cirurgia simulada; OVA, rates ZDF ovariectomitzades; OVA+E2, rates ZDF ovariectomitzades tractades amb 17β-estradiol; TAB, teixit adipós blanc. Els valors s'expressen com la mitjana ± error estàndard de 8 animals per grup. T-Student ( $p < 0,05$ ) a, SHAM vs. LEAN. One-way ANOVA ( $p < 0,05$ ): H, efecte hormonal, NS efecte no significatiu. Test post-hoc LSD de Fisher ( $p < 0,05$ ): b, diferències vs. SHAM; c, diferències vs. OVA.

### **Efecte de l'ovariectomia i l'administració d'E2 sobre paràmetres circulants, la tolerància a la glucosa i a la insulina**

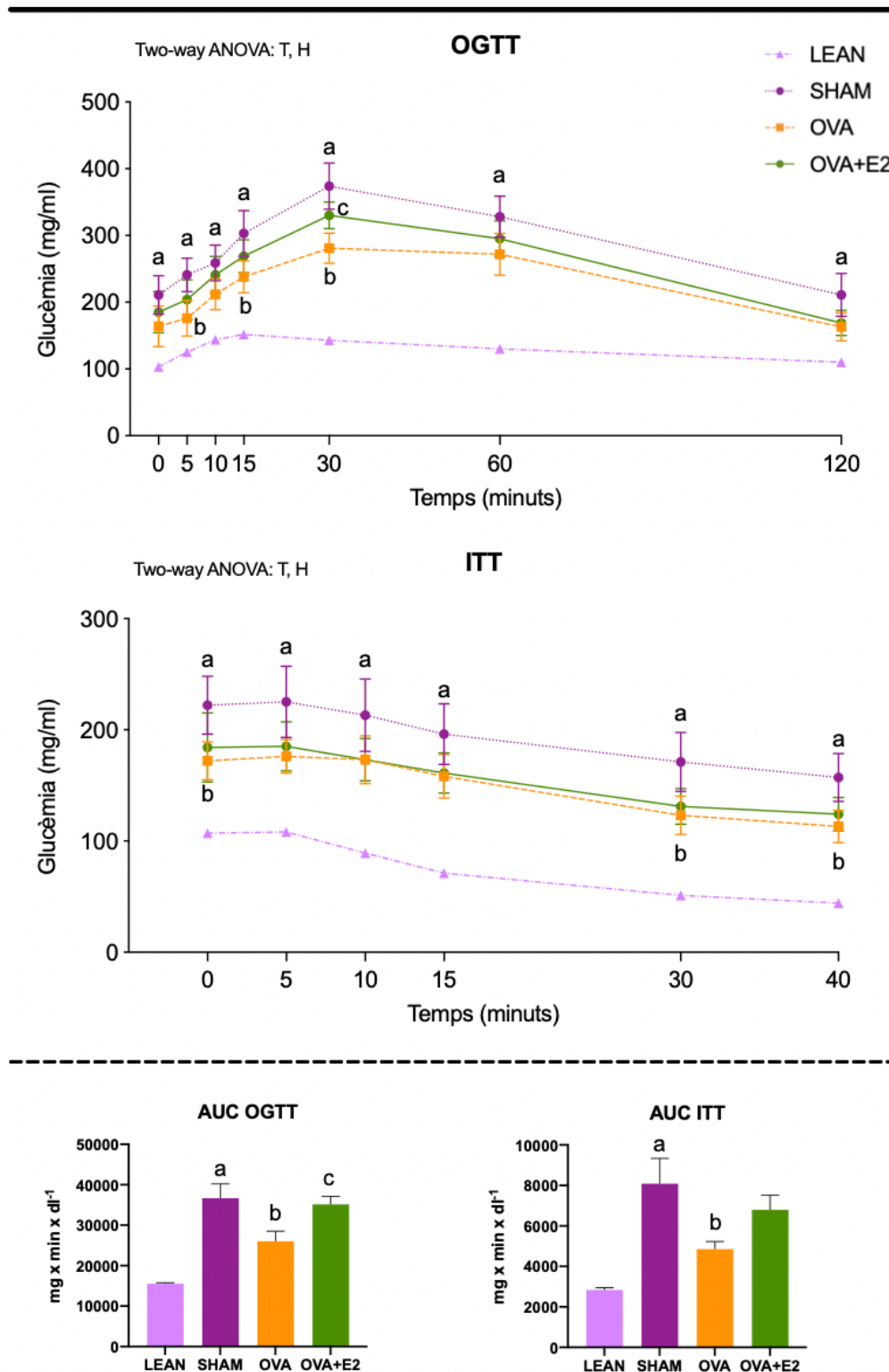
La hiperlipèmia i la hiperglucèmia són factors de risc per al desenvolupament de MCV. Per tal motiu, es va estudiar l'efecte de l'ovariectomia i la suplementació amb E2 sobre aquest factors de risc per poder avaluar la seva contribució a les

alteracions moleculars a nivell cardiovascular. Els nostres resultats (taula 11) varen posar de manifest que les rates OVA mantenien uns nivells de glucèmia per sota de les rates SHAM. L'hemoglobina glucosilada (HbA1c), un indicador indirecte de la glucèmia mitjana, va resultar ser menor també en les rates OVA en comparació a les rates SHAM. A més, es varen realitzar tests per avaluar la tolerància a la glucosa (OGTT) i a la insulina (ITT) i el resultat, no només va confirmar la condició diabètica de les rates fa/fa, sinó que també va posar de manifest una major tolerància a la glucosa i una major sensibilitat a la insulina en el grup OVA respecte a les rates SHAM (figura 9). Per altra banda, el tractament amb E2 del grup OVA va augmentar la glucèmia i va disminuir la tolerància a la glucosa (major AUC OGTT), però no va tenir un efecte significatiu en els nivells d'HbA1c ni en la tolerància a la insulina. Pel que fa als resultats corresponents a l'estudi del perfil lipídic circulant, no es van observar canvis dels nivells sèrics de triglicèrids (TG), àcids grassos lliures (NEFAs) o LDL-colesterol entre els grups SHAM i OVA. No obstant, el tractament amb E2 va provocar un increment notable dels tres marcadors en comparació a la resta de grups (taula 11). Sorprenentment, l'ovariectomia va produir una important elevació dels nivells sèrics d'adiponectina respecte les rates SHAM, que va ser completament revertida en el grup OVA+E2. El rati leptina/adiponectina és un indicador per estimar el risc d'aterosclerosi en la DM2 i es relaciona de forma inversament proporcional a la sensibilitat a la insulina [85]. Com es pot observar, el grup OVA va presentar una reducció d'aquest rati respecte el grup SHAM i el tractament amb E2 (OVA+E2) va produir un increment. De tal manera, els nostres resultats indiquen que les rates OVA tindrien un menor risc d'aterosclerosi i resistència a la insulina que les rates SHAM i les OVA+E2.

	LEAN	SHAM	OVA	OVA+E2	ANOVA
Glucèmia (mg/dl)	115 ± 4	273 ± 39 <sup>a</sup>	176 ± 24 <sup>b</sup>	303 ± 31 <sup>c</sup>	H
HbA1c (%)	4,5 ± 0,5	9,4 ± 0,8 <sup>a</sup>	6,4 ± 0,5 <sup>b</sup>	7,4 ± 0,9	H
Insulinèmia (ng/ml)	1,1 ± 0,2	29,1 ± 3,8 <sup>a</sup>	24,7 ± 2,1	29,7 ± 2,6	NS
HOMA-IR	9,9 ± 2,4	468,7 ± 74,8 <sup>a</sup>	302,2 ± 32,8 <sup>b</sup>	512,6 ± 52,2 <sup>c</sup>	H
QUICKI	0,440 ± 0,160	0,252 ± 0,005 <sup>a</sup>	0,263 ± 0,004 <sup>b</sup>	0,248 ± 0,002 <sup>c</sup>	H
Triglicèridèmia (mg/dl)	57 ± 6	222 ± 17 <sup>a</sup>	213 ± 36	545 ± 89 <sup>b,c</sup>	H
NEFAs (mM)	1,0 ± 0,0	1,1 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,6 ± 0,2 <sup>b,c</sup>	H
LDL-colesterol (mg/dl)	36 ± 4	38 ± 6	70 ± 6	114 ± 22 <sup>b,c</sup>	H
HDL-colesterol (mg/dl)	49 ± 2	42 ± 5	65 ± 2 <sup>b</sup>	52 ± 3 <sup>c</sup>	H
Leptina (ng/ml)	2,9 ± 0,2	5,9 ± 0,2 <sup>a</sup>	6,4 ± 0,4	5,7 ± 0,1	NS
Adiponectina (µg/ml)	12,4 ± 0,8	12,0 ± 1,0	18,4 ± 0,8 <sup>b</sup>	11,9 ± 1,3 <sup>c</sup>	H
Leptina / Adiponectina	0,202 ± 0,02	0,464 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,337 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,520 ± 0,03 <sup>c</sup>	H

**Taula 11. Efecte de l'ovariectomia i l'administració d'E2 sobre biomarcadors del control glucídic, lípids i adipocines a rates femella ZDF.**

LEAN, rates control sanes; SHAM, rates ZDF sotmeses a cirurgia simulada; OVA, rates ZDF ovariectomitzades; OVA+E2, rates ZDF ovariectomitzades tractades amb 17β-estradiol; HOMA-IR: calculat com insulina en sèrum (µU/ml) x glucèmia (mM) / 22,5; QUICKI: calculat com 1 / (Log insulina en sèrum (µU/ml) + Log glucèmia mg/dl); NEFAs, àcids grassos no esterificats. Els valors s'expressen com a mitjana ± error estàndard de 8 animals per grup. T-Student (p<0,05) a, SHAM vs. LEAN. One-way ANOVA (p<0,05): H, efecte hormonal, NS efecte no significatiu. Test post-hoc LSD de Fisher (p<0,05): b, diferències vs. SHAM; c, diferències vs. OVA.



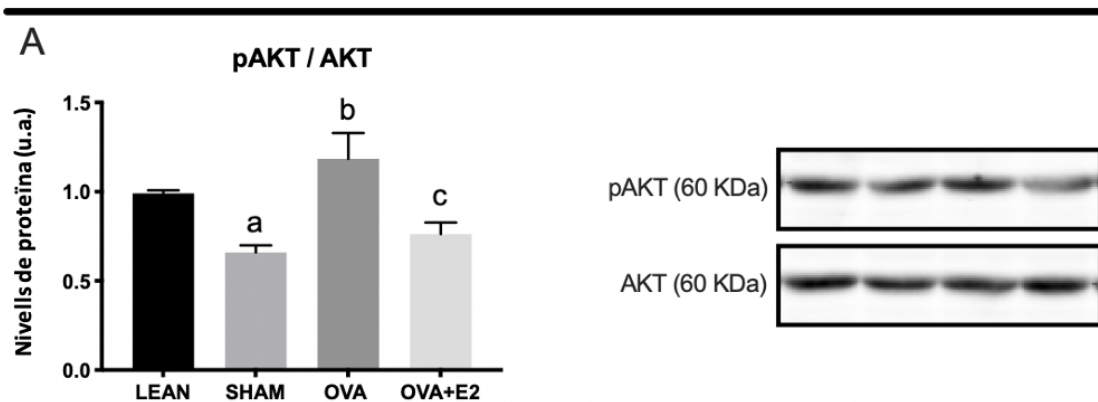
**Figura 9. Efecte de l'ovariectomia i l'administració d'E2 sobre els tests de tolerància a la glucosa (OGTT) i a la insulina (ITT) a rates femella ZDF.**

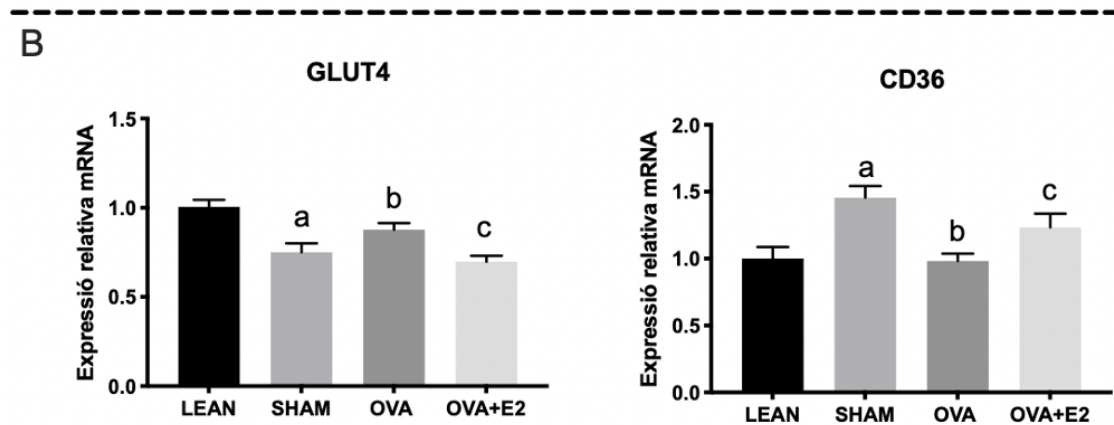
Els tests OGTT i ITT es varen realitzar en dejú a 14 setmanes d'edat. LEAN, rates control sanes; SHAM, rates ZDF sotmeses a cirurgia simulada; OVA, rates ZDF ovariectomitzades; OVA+E2, rates ZDF ovariectomitzades tractades amb 17 $\beta$ -estradiol; AUC, àrea sota la corba. Els valors s'expressen com la mitjana  $\pm$  error estàndard de 8 animals per grup. T-Student ( $p < 0,05$ ) a, SHAM vs. LEAN. Two-way ANOVA ( $p < 0,05$ ): T, efecte temps; H, efecte hormonal. Test post-hoc LSD de Fisher ( $p < 0,05$ ): b, diferències vs. SHAM; c, diferències vs. OVA.



## Efecte de l'ovariectomia i l'administració d'E2 sobre l'activació d'AKT i l'expressió dels transportadors de glucosa i àcids grassos al cor

Un dels principals elements en la senyalització cel·lular de la insulina és l'AKT. L'activació (fosforilació) d'aquesta cinasa promou la captació de glucosa per mitjà del transportador de glucosa GLUT4. Durant la DM, es produeix una resistència als efectes de la insulina i s'observa una menor activació d'AKT, el que condueix a una reducció de la captació de glucosa via GLUT4 i s'incrementa, de forma compensatòria, la captació d'AG per mitjà del transportador CD36. Tot plegat, aquests canvis en la utilització dels substrats energètics produeixen una reprogramació metabòlica al cor que acaba conduint a un estat prooxidant i proinflamatori característic del cor diabètic. Les rates SHAM varen presentar una menor activació d'AKT que les LEAN i l'ovariectomia va suposar un increment en l'activació. No obstant, el tractament amb E2 va suposar una reducció d'aquesta activació (figura 10). L'expressió del transportador de glucosa GLUT4, depenent de l'activació d'AKT, va ser menor en les rates SHAM respecte les LEAN. L'ovariectomia va incrementar l'expressió de GLUT4 mentre que l'administració d'E2 la va disminuir. En relació al transportador d'àcids grassos CD36, les rates SHAM varen presentar una major expressió respecte les LEAN i l'ovariectomia va suposar una reducció. L'administració d'E2 a les rates ovariectomitzades va incrementar-ne l'expressió.



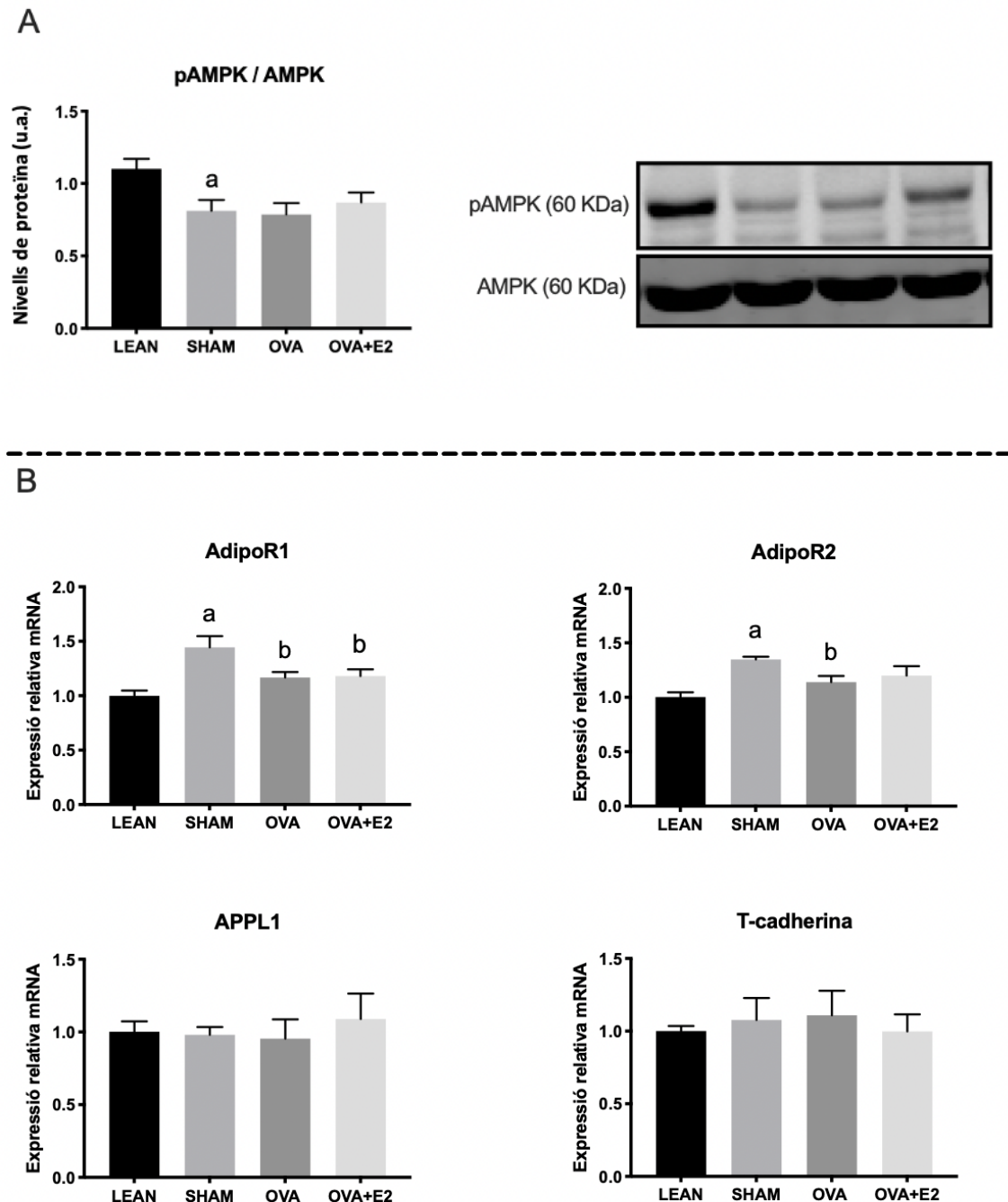


**Figura 10.** Efecte de l'ovariectomia i l'administració d'E2 sobre l'activació d'AKT (A) i l'expressió dels transportadors de substrats energètics (B) al cor de rates femella ZDF.

A: nivells de proteïna normalitzats per GAPDH. B: nivells d'expressió de mRNA normalitzats per GAPDH. LEAN, rates control sanes; SHAM, rates ZDF sotmeses a cirurgia simulada; OVA, rates ZDF ovariectomitzades; OVA+E2, rates ZDF ovariectomitzades tractades amb  $17\beta$ -estradiol. Els valors s'expressen com la mitjana  $\pm$  error estàndard de 8 animals per grup. T-Student ( $p < 0,05$ ) a, SHAM vs. LEAN. One-way ANOVA ( $p < 0,05$ ). Test post-hoc LSD de Fisher ( $p < 0,05$ ): b, diferències vs. SHAM; c, diferències vs. OVA.

### Efecte de l'ovariectomia i l'administració d'E2 sobre l'activació d'AMPK i els nivells de receptors de l'adiponectina al cor

L'adiponectina és una adipocina estretament relacionada amb la connexió teixit adipós-sistema cardiovascular i se li ha atribuït un paper cardioprotector. L'estudi dels elements implicats en la via de senyalització de l'adiponectina al cor (figura 11) va mostrar que les rates SHAM presentaven una menor fosforilació de la cinasa AMPK (clau en la senyalització d'aquesta via) respecte les rates LEAN. Per altra banda, els nivells d'expressió dels receptors AdipoR1 i AdipoR2 a les rates SHAM van ser superiors en comparació a les rates LEAN i, a més, es va observar que l'ovariectomia va induir una disminució de la seva expressió, que no va ser modificada pel tractament amb E2. L'expressió d'APPL1 i T-cadherina es va mantenir inalterada entre els diferents grups experimentals.

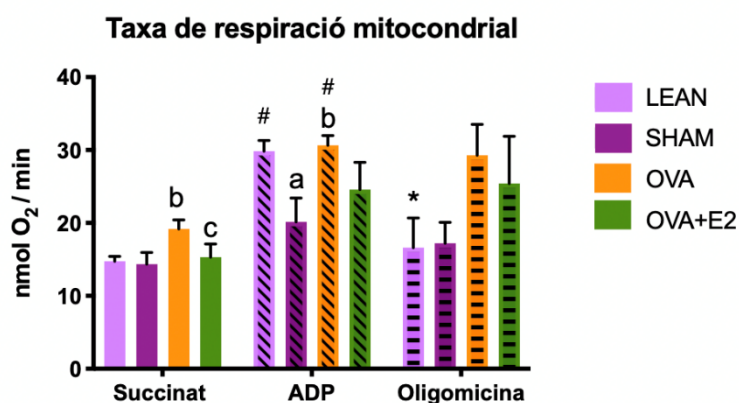


**Figura 11. Efecte de l'ovariectomia i l'administració d'E2 sobre l'activació d'AMPK (A) i receptors de l'adiponectina (B) al cor de rates femella ZDF.**

A: nivells de proteïna normalitzats per GAPDH. B: nivells d'expressió de mRNA normalitzats per GAPDH. LEAN, rates control sanes; SHAM, rates ZDF sotmeses a cirurgia simulada; OVA, rates ZDF ovariectomitzades; OVA+E2, rates ZDF ovariectomitzades tractades amb  $17\beta$ -estradiol. Els valors s'expressen com la mitjana  $\pm$  error estàndard de 8 animals per grup. T-Student ( $p < 0,05$ ) a, SHAM vs. LEAN. One-way ANOVA ( $p < 0,05$ ). Test post-hoc LSD de Fisher ( $p < 0,05$ ): b, diferències vs. SHAM, c, diferències vs. OVA.

## Efecte de l'ovariectomia i l'administració d'E2 sobre marcadors de biogènesi i funció mitocondrial al cor

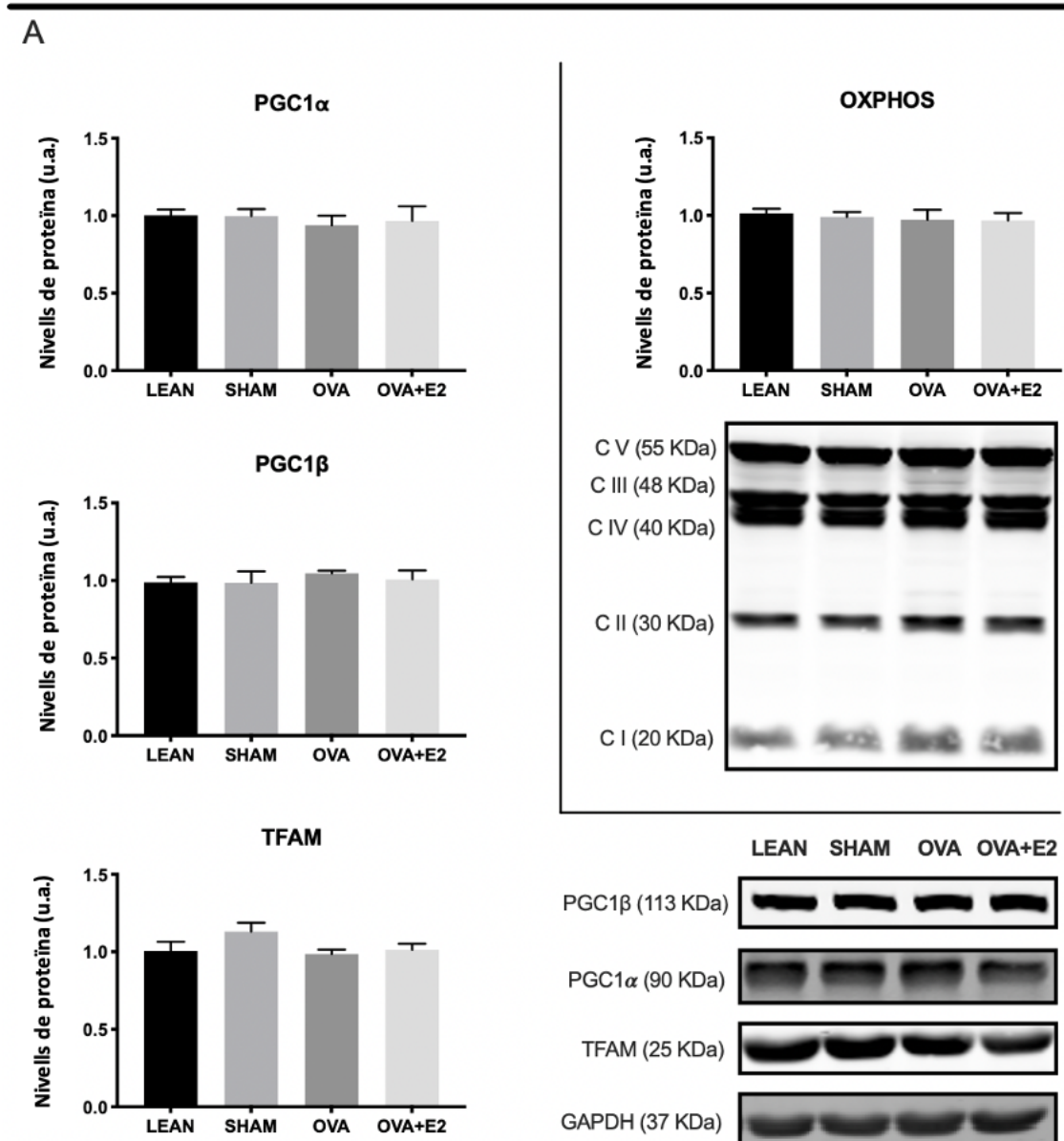
Atesa la implicació de la disfunció mitocondrial en patologies com la diabetis i la cardiomiopatia diabètica vàrem realitzar un estudi sobre la funció mitocondrial cor de les rates ZDF. Els nostres resultats mostraren que l'ovariectomia va produir un major consum d'oxigen, respecte SHAM i OVA+E2, tan amb succinat com amb ADP. A més, sota condicions d'estimulació amb ADP, les rates SHAM mostraren una menor respiració que les rates LEAN i l'ovariectomia va produir un augment del consum d'oxigen que no va ser reproduït a les rates tractades amb E2. Curiosament, els mitocondris dels tres grups de rates fa/fa varen mostrar insensibilitat a la oligomicina, no sent així al grup fa/+ (figura 12).

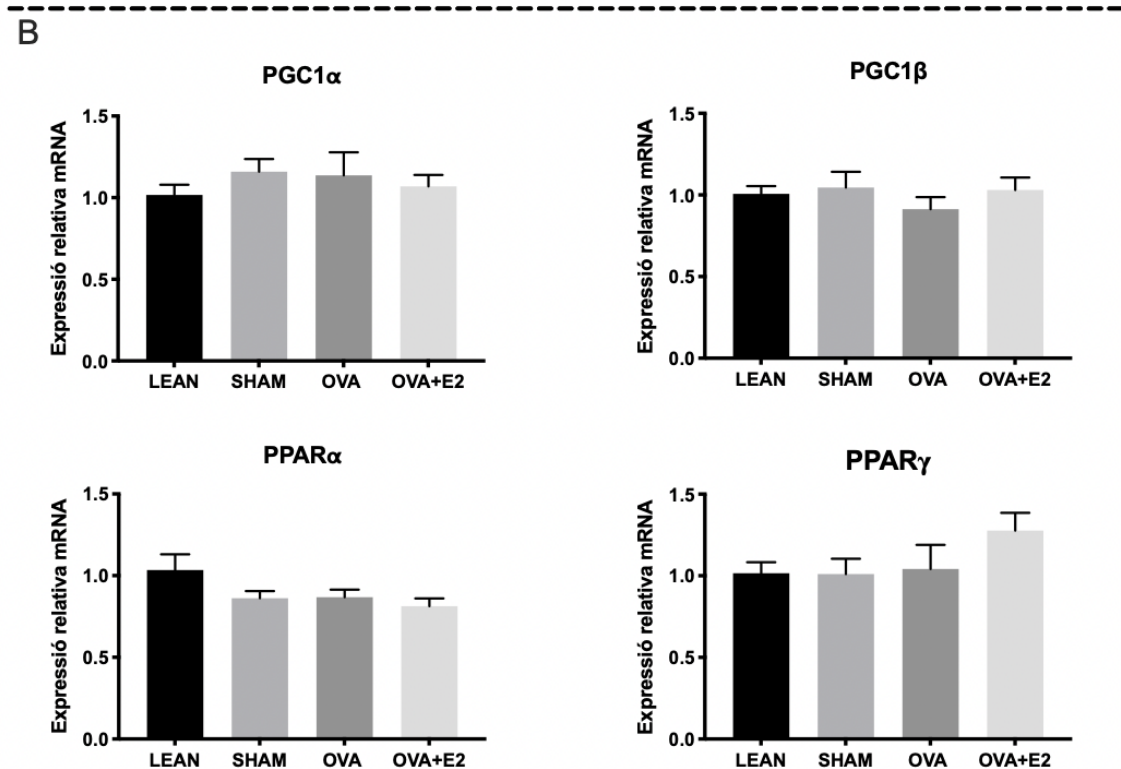


**Figura 12.** Efecte de l'ovariectomia i l'administració d'E2 sobre la taxa de respiració de mitocondris aïllats del cor de rates femella ZDF.

LEAN, rates control sanes; SHAM, rates ZDF sotmeses a cirurgia simulada; OVA, rates ZDF ovariectomitzades; OVA+E2, rates ZDF ovariectomitzades tractades amb  $17\beta$ -estradiol. Els valors s'expressen com la mitjana  $\pm$  error estàndard de 8 animals per grup. T-Student ( $p < 0,05$ ) a, SHAM vs. LEAN. One-way ANOVA ( $p < 0,05$ ). Test post-hoc LSD de Fisher ( $p < 0,05$ ): b, diferències vs. SHAM; c, diferències vs. OVA; #, diferències vs. Succinat; \*, diferències vs. ADP.

Curiosament, la quantificació dels nivells de proteïnes implicades en la biogènesi mitocondrial i la regulació del metabolisme, com PGC1 $\alpha$  i PGC1 $\beta$ , i altres proteïnes relacionades amb el contingut i funció mitocondrial com TFAM i les proteïnes OXPPOS no va mostrar canvis entre els diferents grups experimentals (figura 13 A). Per altra banda, l'estudi de l'expressió dels gens PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , PGC1 $\alpha$  i PGC1 $\beta$  va donar resultats similars i tampoc s'observaren canvis (figura 13 B).



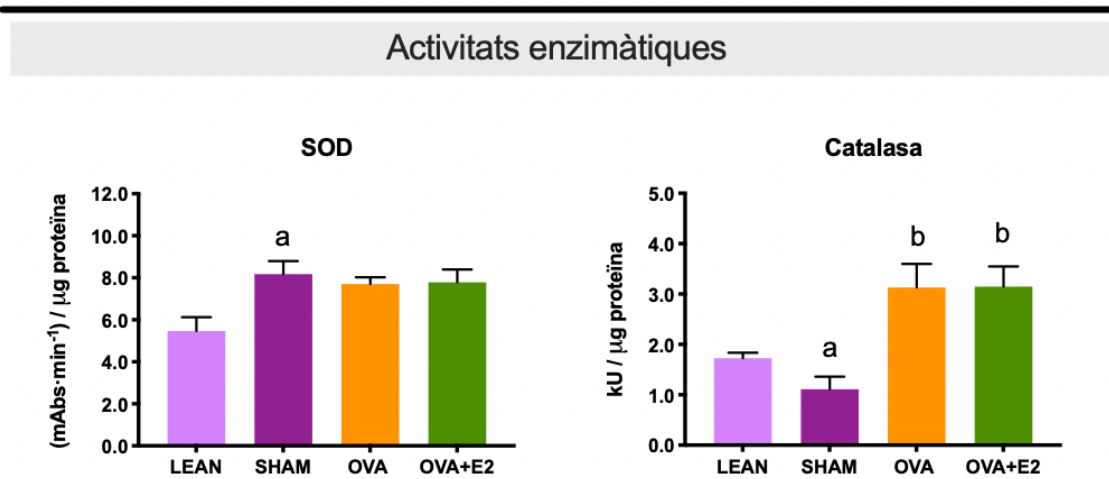


**Figura 13. Efecte de l'ovariectomia i l'administració d'E2 sobre marcadors de biogènesi i funció mitocondrial (A i B) al cor de rates femella ZDF.**

*A: nivells de proteïna normalitzats per GAPDH. B: nivells d'expressió de mRNA normalitzats per GAPDH. LEAN, rates control sanes; SHAM, rates ZDF sotmeses a cirurgia simulada; OVA, rates ZDF ovariectomitzades; OVA+E2, rates ZDF ovariectomitzades tractades amb 17 $\beta$ -estradiol. Els valors s'expressen com a mitjana  $\pm$  error estàndard de 8 animals per grup. T-Student ( $p < 0,05$ ) a, SHAM vs. LEAN. One-way ANOVA ( $p < 0,05$ ). Test post-hoc LSD de Fisher ( $p < 0,05$ ): b, diferències vs. SHAM, c, diferències vs. OVA.*

### **Efecte de l'ovariectomia i l'administració d'E2 sobre enzims antioxidants i proteïnes desacobllants al cor**

Per tal de comparar la capacitat antioxidant en el teixit cardíac dels diferents grups experimentals es varen dur a terme determinacions de l'activitat màxima d'alguns enzims implicats en la detoxificació de les ROS. Els resultats obtinguts mostraren que l'activitat superòxid dismutasa (SOD) es trobava augmentada en les rates SHAM respecte el seu control LEAN i ni l'ovariectomia ni la suplementació amb E2 suposaren cap canvi. Per una altra banda, es va veure un descens en l'activitat catalasa de les rates SHAM, respecte les LEAN, que va ser fortament contrarestat per l'ovariectomia (figura 14). No obstant, el tractament amb E2 no va suposar cap canvi respecte l'ovariectomia.

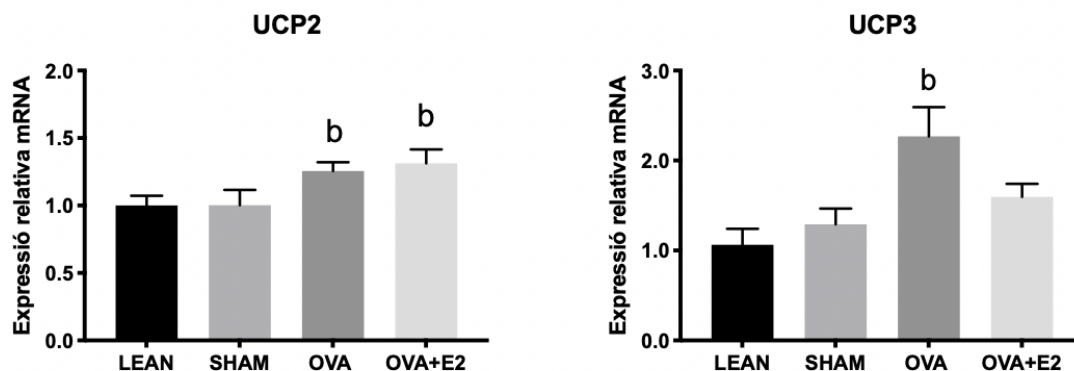


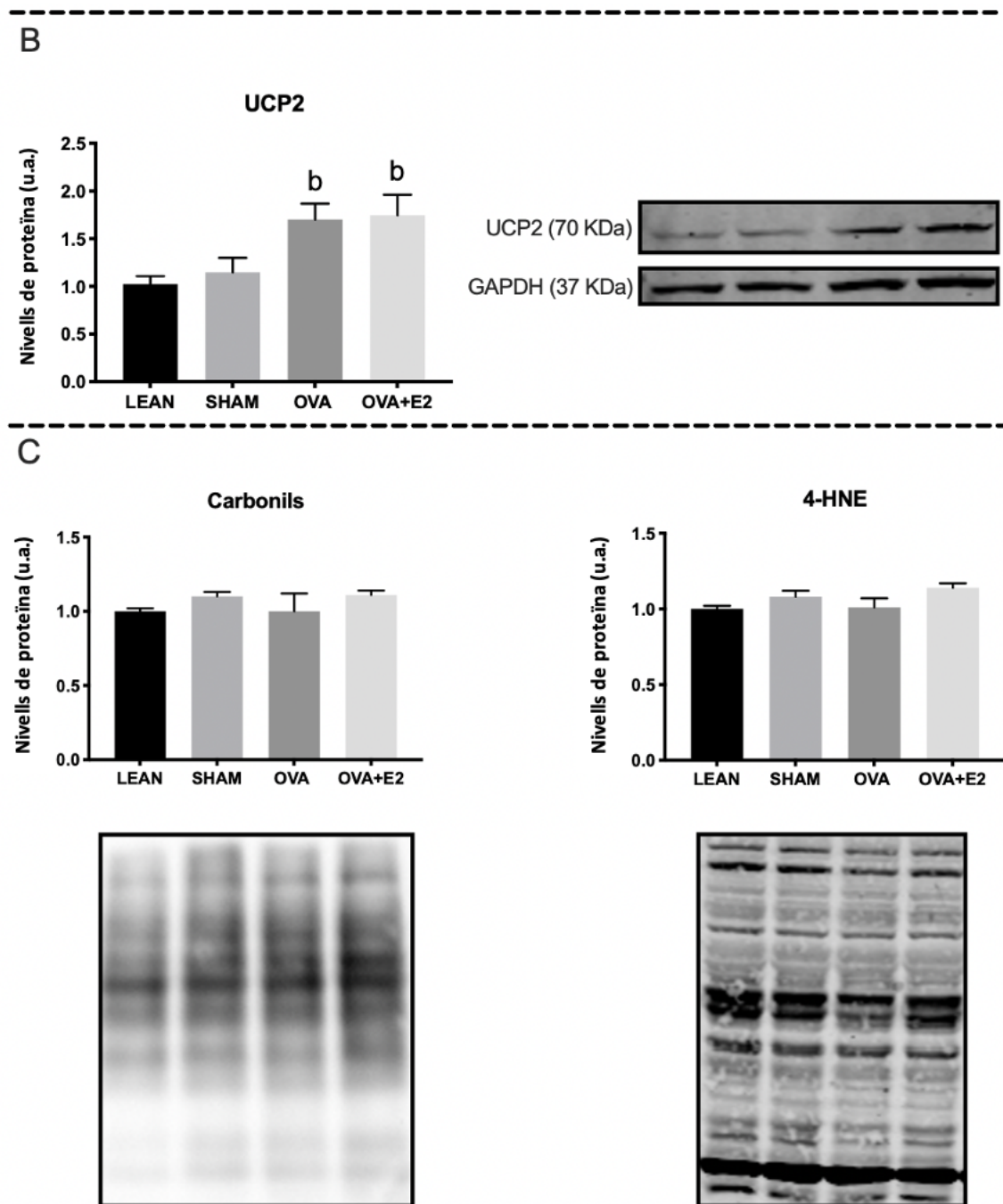
**Figura 14.** Efecte de l'ovariectomia i l'administració d'E2 sobre l'activitat d'enzims antioxidants al cor de rates femella ZDF.

*SOD, superòxid dismutasa; LEAN, rates control sanes; SHAM, rates ZDF sotmeses a cirurgia simulada; OVA, rates ZDF ovariectomitzades; OVA+E2, rates ZDF ovariectomitzades tractades amb 17β-estradiol. Els valors s'expressen com a mitjana ± error estàndard de 8 animals per grup. T-Student ( $p < 0,05$ ) a, SHAM vs. LEAN. One-way ANOVA ( $p < 0,05$ ). Test post-hoc LSD de Fisher ( $p < 0,05$ ): b, diferències vs. SHAM, c, diferències vs. OVA.*

Paral·lelament, l'estudi de l'expressió de les proteïnes desacoblants de la cadena respiratòria UCP2 i UCP3 (figura 15 A), així com els nivells proteics d'UCP2 al teixit cardíac (figura 15 B) mostraren un augment al grup OVA que també es va observar al grup OVA+E2 en el cas de la UCP2 però no en la UCP3. Amb la finalitat de determinar si els diferents grups experimentals presentaven un major o menor dany oxidatiu al cor, es va quantificar el grau relatiu de peroxidació lipídica (4-HNE) i d'oxidació de proteïnes (carbonils). Segons indiquen els nostres resultats no s'observen diferències significatives entre grups (figura 15 C).

A





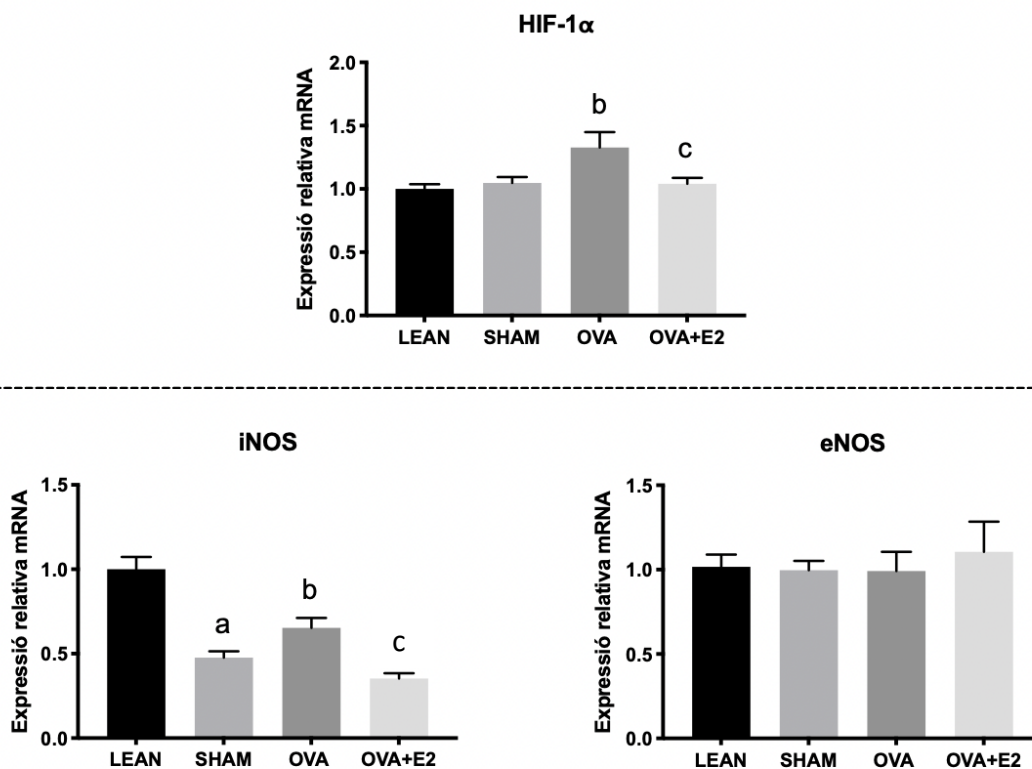
**Figura 15. Efecte de l'ovariectomia i l'administració d'E2 sobre proteïnes desacoblants (A i B) i dany oxidatiu (C) al cor de rates femella ZDF.**

A: nivells d'expressió de mRNA normalitzats per GAPDH. B i C: nivells de proteïna normalitzats per GAPDH. LEAN, rates control sanes; SHAM, rates ZDF sotmeses a cirurgia simulada; OVA, rates ZDF ovariectomitzades; OVA+E2, rates ZDF ovariectomitzades tractades amb  $17\beta$ -estradiol; els valors s'expressen com a mitjana  $\pm$  error estàndard de 8 animals per grup. T-Student ( $p < 0,05$ ) a, SHAM vs. LEAN. One-way ANOVA ( $p < 0,05$ ). Test post-hoc LSD de Fisher ( $p < 0,05$ ): b, diferències vs. SHAM, c, diferències vs. OVA.



## Efecte de l'ovariectomia i l'administració d'E2 sobre marcadors d'hipòxia i enzims implicats en la síntesi d'òxid nítric al cor

En aquest apartat s'analitzen els efectes de les hormones sexuals sobre el factor induïble per hipòxia (HIF-1 $\alpha$ ), relacionat amb la capacitat de resposta del teixits front situacions d'hipòxia, i enzims implicats en la síntesi d'òxid nítric (NO), un important vasodilatador.



**Figura 16. Efectes de l'ovariectomia i l'administració d'E2 sobre marcadors d'hipòxia i enzims implicats en la síntesi de NO en el cor de rates femella ZDF.**

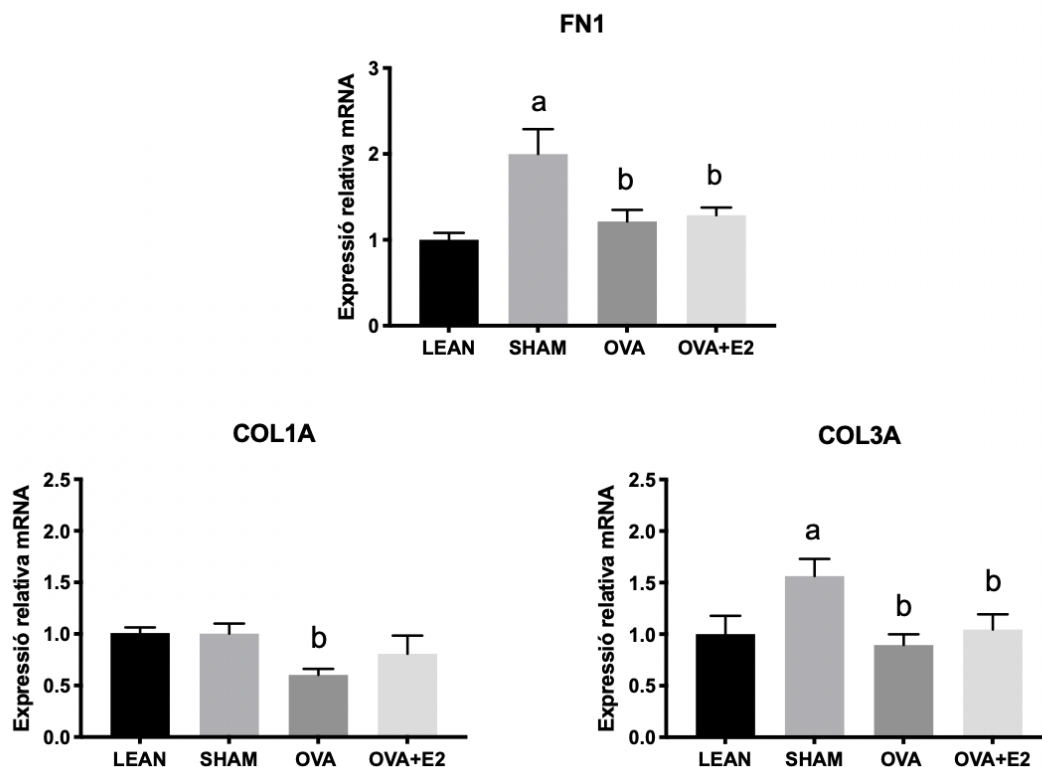
Nivells d'expressió de mRNA normalitzats per GAPDH. LEAN, rates control sanes; SHAM, sotmeses a cirurgia simulada; OVA, rates ovariectomitzades; OVA+E2, rates ovariectomitzades tractades amb 17 $\beta$ -estradiol; els valors s'expressen com a mitjana  $\pm$  error estàndard de 8 animals per grup. T-Student ( $p < 0,05$ ) a, SHAM vs. LEAN. One-way ANOVA ( $p < 0,05$ ). Test post-hoc LSD de Fisher ( $p < 0,05$ ): b, diferències vs. SHAM; c, diferències vs. OVA.

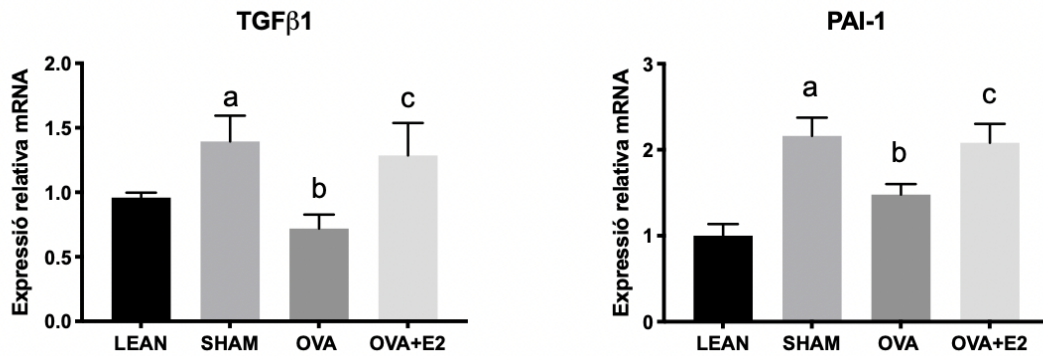
Tal i com s'observa a la figura 16, es va veure un important increment en l'expressió d'HIF1 $\alpha$  a les rates OVA però no a les OVA+E2, que varen presentar nivells similars al grup SHAM. Per altra banda, mentre que no es varen trobar diferències en l'expressió d'eNOS si que hi va haver importants variacions en

l'expressió de la sintasa iNOS. Concretament, tot i que les rates SHAM varen mostrar una menor expressió que les rates LEAN, l'ovariectomia va induir un increment en l'expressió d'iNOS que es va reduir significativament amb la suplementació amb E2.

### Efecte de l'ovariectomia i l'administració d'E2 sobre marcadors de fibrosi al cor

La fibrosi del teixit cardíac està relacionada amb la disfunció cardíaca. L'estudi de l'expressió dels principals marcadors de fibrosi cardíaca com són el col·lagen I (COL1A), el col·lagen III (COL3A) i la fibronectina (FN1) va posar de manifest que l'ovariectomia va reduir la seva expressió, la qual no va ser modificada pel tractament amb E2 (figura 17). Paral·lelament, la determinació de l'expressió relativa de dos importants inductors de la fibrosi, com són el TGF $\beta$ 1 i el PAI-1, varen revelar una disminució de la seva expressió en el grup OVA. Per altra banda, el tractament amb E2 a les rates ovariectomitzades va produir un augment de l'expressió de TGF $\beta$ 1, així com també de PAI-1 (figura 17).



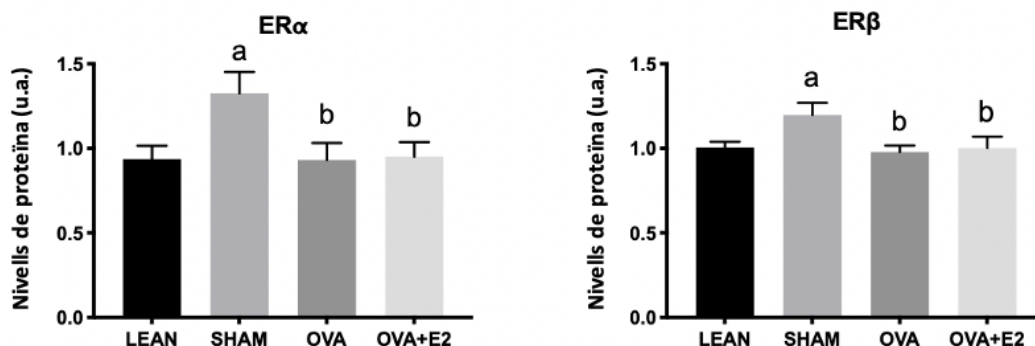


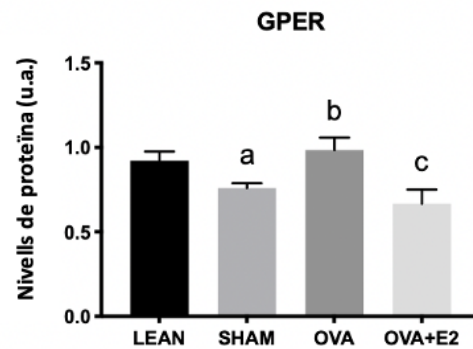
**Figura 17.** Efecte de l'ovariectomia i l'administració d'E2 sobre l'expressió de marcadors de fibrosi al cor de rates femella ZDF.

Nivells d'expressió de mRNA normalitzats per GAPDH. LEAN, rates control sanes; SHAM, sotmeses a cirurgia simulada; OVA, rates ovariectomitzades; OVA+E2, rates ovariectomitzades tractades amb  $17\beta$ -estradiol; els valors s'expressen com a mitjana  $\pm$  error estàndard de 8 animals per grup. T-Student ( $p < 0,05$ ) a, SHAM vs. LEAN. One-way ANOVA ( $p < 0,05$ ). Test post-hoc LSD de Fisher ( $p < 0,05$ ): b, diferències vs. SHAM; c, diferències vs. OVA.

### Efecte de l'ovariectomia i l'administració d'E2 sobre els receptors d'estrògens al cor

Els resultats (figura 18) mostraren que les rates SHAM tenien una major dotació de ER $\alpha$  i ER $\beta$  que les LEAN però una menor dotació de GPER. Al contrari, l'ovariectomia va disminuir ER $\alpha$  i ER $\beta$  fins a nivells similars a les rates LEAN però va estimular GPER respecte les SHAM. El tractament amb E2 no va alterar els nivells de ER $\alpha$  i ER $\beta$  però va produir una disminució de GPER, respecte les rates OVA, a nivells similars als del grup SHAM.





**Figura 18.** Efecte de l'ovariectomia i l'administració d'E2 sobre els nivells de receptors d'estrògens al cor de rates femella ZDF.

Nivells de proteïna normalitzats per GAPDH. LEAN, rates control sanes; SHAM, sotmeses a cirurgia simulada; OVA, rates ovariectomitzades; OVA+E2, rates ovariectomitzades tractades amb  $17\beta$ -estradiol; els valors s'expressen com a mitjana  $\pm$  error estàndard de 8 animals per grup. T-Student ( $p < 0,05$ ) a, SHAM vs. LEAN. One-way ANOVA ( $p < 0,05$ ). Test post-hoc LSD de Fisher ( $p < 0,05$ ): b, diferències vs. SHAM; c, diferències vs. OVA.

#### 4.1.2 Discussió

En rates normopès, s'ha descrit que la supressió hormonal a través de l'ovariectomia bilateral produeix un augment de pes corporal i un augment de la ingesta que va acompanyat d'un increment de la glucèmia i la resistència a la insulina. Per altra banda, el tractament de les rates OVA amb E2 suprimeix aquests efectes [63]–[66]. Així doncs, en rates, està prou evidenciat l'efecte protector dels estrògens, i concretament de l'E2, pel que fa al desenvolupament d'obesitat i resistència a la insulina. No obstant, hi ha evidències sobre l'efecte dual que podria tenir l'E2 en el context de la diabetat. Com ja s'ha explicat, l'E2 té un efecte protector front el desenvolupament d'obesitat i resistència a la insulina però una vegada instaurada la diabetat, les hormones sexuals, i en concret l'E2, podria tenir un efecte perjudicial a nivell cardiovascular i cerebrovascular [86]–[88]. En humans també hi ha evidències sòlides sobre l'increment del risc de mort i de sofrir un accident cardiovascular i cerebrovascular en dones (premenopàusiques) diabètiques [5], i dels riscos de la teràpia hormonal substitutiva (THS) en dones obesas i/o diabètiques [68], [69].

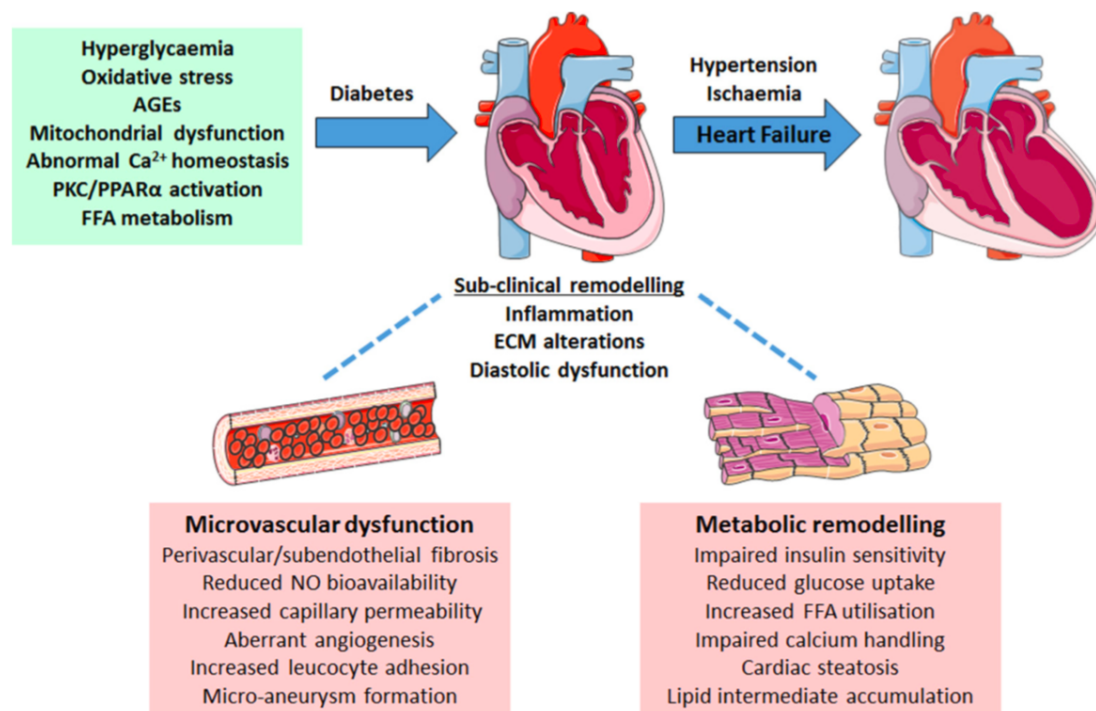
Per tot això, és important esclarir la contribució de les hormones sexuals femenines, i en concret la de l'E2, en la fisiopatologia cardiovascular en la diabetis.

Els nostres resultats varen mostrar que la modulació hormonal va tenir un marcat efecte sobre els principals indicadors del control de la glucèmia. De forma general, les rates ovariectomitzades mostraren un perfil glucídic i lipídic circulant més cardiosaludable que les rates diabètiques control i que les tractades amb E2. Concretament, l'ovariectomia va produir una millora de la glucèmia basal i una major tolerància a la càrrega oral de glucosa, així com també va suposar una reducció de l'hemoglobina glucosilada. Els índex calculats per a determinar la resistència/sensibilitat a la insulina, com són l'HOMA-IR i el QUICKI, varen posar de manifest que les rates OVA, efectivament, presentaven una major sensibilitat a la insulina i que el tractament amb E2 anul·lava aquesta millora i produïa un resultat comparable al de les rates SHAM.

El risc cardiovascular també està estretament associat als nivells de lípids circulants en sang, especialment als TG, al colesterol total i al colesterol-LDL (colesterol portat per lipoproteïnes de baixa densitat) [89],[90] i, a més, la DM2 contribueix a incrementar el risc cardiovascular perquè agreuja la dislipèmia [91]. En aquest aspecte, els nostres resultats mostraren que l'ovariectomia, tot i produir un increment de pes, no va modificar cap dels paràmetres estudiats (TG, NEFAs, LDL). En aquest sentit, diferents grups de recerca també han indicat que l'ovariectomia no sempre va acompanyada de canvis en el perfil circulant de NEFA [63] o colesterol total, HDL i LDL [92]. Per altra banda, el tractament amb E2 de les rates ovariectomitzades va suposar un increment substancial dels marcadors lipídics, la qual cosa no deixa de sorprendre si es compara amb estudis realitzats amb rates normopès i sense diabetis, en les que o bé el tractament no altera els valors de LDL, TG i NEFAs o bé suposa un lleuger descens [92], [93]. En aquest sentit, s'ha de tenir en compte que el pes corporal i l'adipositat de les rates

OVA+E2 varen ser marcadament inferiors als de la resta de grups diabètics, la qual cosa estaria d'acord amb la menor ingesta observada en aquest grup, resultats que pareixen contrastar amb el perfil lipídic menys saludable que presenten aquests animals.

Està àmpliament acceptat que durant la diabetis es produeixen canvis estructurals i metabòlics en el cor que comprometen la seva funcionalitat, i estan directament relacionats amb la glucèmia i la resistència a la insulina [16], [18], [94], [95] (a la figura 19 es recullen de forma gràfica i resumida). De fet, les MCV són la primera causa de mort entre les persones diabètiques [3]. Per tant, per tal d'aprofundir en el paper de les hormones sexuals femenines a nivell cardíac és pertinent estudiar la via de senyalització de la insulina. Concretament es va determinar l'activació de la via mitjançant la fosforilació d'AKT (també coneguda com PKB) que és un element clau de la via de la insulina, així com l'expressió de GLUT4, el principal transportador de glucosa al cor.



**Figura 19. Remodelació cardíaca subclínica durant la diabetis**

Font: *Reactive oxygen species signalling in the diabetic heart: emerging prospect for therapeutic targeting* (2017). [27]

Els nostres resultats varen mostrar que les rates diabètiques tenien una menor activació de la via de senyalització de la insulina i una menor expressió de GLUT4 que les control sanes. Ara bé, l'ovariectomia va tenir un efecte positiu en l'activació de l'AKT i l'expressió de GLUT4 en el grup OVA, en comparació a la resta de grups el que implicaria una millor funcionalitat de la senyalització de la insulina al cor. Aquesta resposta a nivell molecular està en consonància amb la major sensibilitat a la insulina de les rates ovariectomitzades observada a nivell sistèmic mitjançant el test ITT. Paral·lelament, també vàrem estudiar l'expressió de CD36, un translocador d'AG que permet la seva entrada a les cèl·lules, i pot determinar de forma indirecta el grau de captació de lípids al teixit cardíac. Està ben establert que la diabetis altera el metabolisme cardíac i produeix canvis en la preferència de combustibles, incrementant l'expressió de CD36 i reduint l'expressió de GLUT4 [96][97]. El correcte balanç entre oxidació d'AG i glucosa és imprescindible per satisfer la demanda energètica al cor. Tot i que al cor la majoria de l'energia s'obté a través de l'oxidació d'AG, s'ha vist que és molt important una certa flexibilitat metabòlica i que una part de l'energia provingui de l'oxidació de glucosa [16], [94], [95]. Així doncs, la major expressió de GLUT4 juntament amb la menor expressió de CD36, al cor de les rates ovariectomitzades, suggereix que es mantindria de forma més eficient el balanç entre captació d'AG i glucosa. A més, l'expressió de CD36 no només està associada a la captació d'AG, sinó que també s'ha vist que el seu augment està lligat a desequilibris en la regulació del fluxos de calci, importants per a la correcta contracció del múscul cardíac, i a la inflamació [22]. Aquí es podria relacionar amb major eficiència en el funcionament del múscul cardíac a les OVA.

En relació al teixit adipós i a la seva connexió amb la salut cardiovascular, l'adiponectina sembla que té un paper important donat que aquesta adipocina posseeix efectes antiinflamatoris, ajuda a mantenir el to vascular i millora la sensibilitat a la insulina en diferents teixits [98], [99]. L'acció en els teixits es dona

principalment a través dels receptors de membrana AdipoR1 i AdipoR2, encara que hi ha altres elements com la T-cadherina que, tot i no considerar-se un receptor com a tal per manca de domini intracel·lular, també participa en la senyalització retenint l'adiponectina a la membrana cel·lular el que facilita l'activació dels receptors [98], [100]. Aquesta menor expressió d'AdipoR1 i AdipoR2 al cor de les rates ovariectomitzades no va ser un resultat del tot inesperat malgrat la major adiponectinèmia que s'observa en aquest grup, degut a que en investigacions prèvies realitzades pel nostre grup i altres, ja s'havia posat de manifest una reducció en l'expressió d'AdipoR1 al múscul esquelètic i al cor de rates ovariectomitzades amb i sense diabetis [63], [86]. Tot i això, cal indicar que a diferència d'altres estudis, el tractament amb E2 no va propiciar la recuperació dels nivells de l'expressió dels receptors d'adiponectina, resultat que podria estar condicionat per el tipus d'administració i la dosi de l'E2 utilitzada. La regulació de l'expressió d'AdipoR1/R2 és a dia d'avui una incògnita ja que s'han investigat nombroses situacions com la dieta hiperlipídica, el dejuni a diferents temps, presència de diabetis i obesitat, exercici físic... en diferents models animals i en humans i no s'ha pogut arribar a cap conclusió ferma sobre què i com es regula l'expressió dels receptors d'adiponectina [101]. L'anàlisi dels nivells sèrics d'adiponectina va indicar que l'ovariectomia va induir una major producció i secreció d'adiponectina i el tractament amb E2 els va disminuir a nivells similars al grup SHAM. Aquest fenomen ja ha estat descrit en estudis en humans i s'ha vist que l'adiponectinèmia està inversament relacionada amb els nivells d'E2 en plasma [102]. En rates ovariectomitzades sense obesitat ni diabetis prèvia també s'han observat increments de l'adiponectinèmia induïda per l'ovariectomia [92] i en estudis previs del nostre grup també s'ha observat que l'administració d'E2 revertia l'increment causat per l'ovariectomia [63]. La major adiponectinèmia a les rates OVA podria ajudar a explicar la millor sensibilitat a la insulina d'aquest grup [98], [103]. No obstant això, l'estudi sobre la via de senyalització de l'adiponectina a través del major efector, la cinasa AMPK, indica una menor



activació de la via en totes les rates fa/fa, el que indicaria una possible resistència als seus efectes. Per altra banda, APPL1 és una proteïna encarregada d'iniciar la senyalització intracel·lular a l'adiponectina per interacció directa amb els receptors AdipoR1 i AdipoR2 i també intervé en la sensibilització cel·lular a la insulina via l'eix PI3K/AKT [98]. Atès l'increment de l'activació d'AKT al cor de les rates ovariectomitzades i als elevats nivells circulants d'adiponectina en aquestes rates, hom esperaria un increment paral·lel en APPL1, que no es va donar. Tot i això, és important aclarir que APPL1 no és imprescindible per a l'activació d'AKT. Això sí, els nostres resultats semblen indicar que la presència o no d'hormones sexuals femenines no té un efecte directe sobre la via de l'adiponectina al cor, ja que no es varen observar variacions en els principals mediadors intracel·lulars de la via de senyalització de l'adiponectina, com AMPK i APPL1. És important recordar que tot i les diferències entre grups degudes a la manipulació hormonal, totes les rates fa/fa són hiperinsulinèmiques, obeses, diabètiques i hiperleptinèmiques en major o menor mesura i, per tant, aquest fet podria prevaler sobre els efectes de les hormones sexuals, per exemple, en la reducció de l'activació d'AMPK.

La funció mitocondrial al cor és un element important per a satisfer l'elevada demanda energètica d'aquest òrgan. La diabetis i l'obesitat són condicions que suposen una disfunció en el mitocondri i amb el temps contribueixen al desenvolupament de la disfunció cardíaca [104]–[106]. Els experiments de funció mitocondrial, mesurada a través taxa de respiració, tan en fibres musculars permeabilitzades com en mitocondris cardíacs aïllats, han posat de manifest un menor consum d'oxigen en rates diabètiques [107]–[109]. El major consum d'oxigen observat tan en l'estat basal (estat II) com en l'estimulat per ADP (estat III) mostrat en el grup OVA, en comparació amb els grups SHAM i OVA+E2, es relacionaria amb una millor eficiència del mitocondri i podria contribuir a explicar la menor disfunció metabòlica en aquest grup. Per altra banda, la manca de

sensibilitat dels mitocondris del cor per l'oligomicina (un inhibidor de la  $F_1F_0$ -ATPasa) va ser un resultat sorprenent. S'ha descrit que la  $F_1F_0$ -ATPasa té un domini extern que uneix les subunitat  $F_1$  i  $F_0$  que es coneix amb els nom de *oligomycin-sensitivity conferring protein* (OSCP) i s'ha posat de manifest que hi ha nombroses substàncies i situacions, com la diabetis, que poden modificar la sensibilitat de la  $F_1F_0$ -ATPasa als inhibidors com la oligomicina [110]. Juntament amb el fet que els mitocondris de les rates LEAN sí varen respondre a aquest inhibidor arribam a la conclusió que no es pot descartar que la manca de sensibilitat a la oligomicina es tracti d'un efecte associat al genotip *fa/fa*. L'estudi del metabolisme oxidatiu mitocondrial es va completar amb la determinació dels nivells de proteïnes de la cadena respiratòria (OXPHOS), així com el grau d'expressió i els nivells de proteïna dels principals reguladors de la biogènesi mitocondrial (PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , PGC1 $\alpha$ , PGC1 $\beta$  i TFAM). No obstant això, no es va observar cap canvi destacable en aquests paràmetres. Pel que fa a la capacitat antioxidant dels mitocondris, les UCPs són proteïnes conegudes per dissipar el potencial de membrana i desacoblar la cadena respiratòria de la producció d'ATP, el que s'ha relacionat amb un efecte antioxidant al cor [111], [112]. Els nostres resultats sobre l'expressió d'UCP2 i UCP3 suggereixen que les rates OVA i OVA+E2 tindrien una millor capacitat antioxidant que aniria acompanyada per una millora de l'activitat catalasa, també amb conegut efecte antioxidant. El principal efecte nociu de la producció aberrant de radicals lliures és l'oxidació de proteïnes i lípids cel·lulars el que implica una alteració en la seva estructura química que pot afectar a la seva funcionalitat. Els resultats obtinguts en la determinació del dany oxidatiu a lípids i proteïnes del cor tenen implicacions diverses. Per una banda, el major consum basal d'oxigen determinat en els mitocondris cardíacs de les rates OVA podria suposar una major producció de radicals lliures, però l'increment en l'expressió d'UCP2 i UCP3 i en l'activitat de l'enzim catalasa, podria explicar que no es manifestin increments en els nivells de peroxidació lipídica i carbonils. I per altra banda, l'edat de les rates també podria ser un factor a tenir en compte i que

les rates del nostre model es trobessin en un estat primerenc de la disfunció cardíaca i que encara no presentessin el dany oxidatiu que manifesten rates ZDF d'edat més avançada [113]. Tot plegat, el major consum d'oxigen mitocondrial observat a les rates OVA juntament amb una millor capacitat antioxidant i un millor balanç en l'ús dels substrats energètics suggereix una millor eficiència energètica en aquest grup.

El múscul cardíac és un teixit amb una elevada demanda d'oxigen i tan l'obesitat com la diabetis comprometen la satisfacció d'aquesta demanda perquè promouen alteracions a nivell vascular. S'ha descrit que l'E2 és capaç d'induir la relaxació de l'endoteli vascular a través de la producció d'NO i que aquest fet podria contribuir a explicar els efectes cardioprotectors dels estrògens. Ara bé, atès el major risc coronari en les dones diabètiques premenopàusiques, que s'ha comentat anteriorment, cal estudiar si aquest efecte cardioprotector de les hormones sexuals femenines es podria convertir en un efecte deleteri o menys saludable durant la diabetis. La síntesi d'NO és força complexa i depèn de diferents isoformes de la sintasa d'òxid nítric (eNOS, iNOS, nNOS...) que tenen capacitat de síntesi diferent i s'expressen en teixits variats i sota estímuls molt concrets. Mentre que eNOS (la isoforma endotelial) està relacionada amb la síntesi constitutiva de NO en baixes quantitats i es considera cardioprotectora, la síntesi de NO de forma induïda per iNOS genera controvèrsia perquè s'ha vist involucrada en efectes beneficiosos i deleteris [114]. Tot i les controvèrsies entorn al paper d'iNOS, un dels punts també a tenir en compte per poder valorar si el seu efecte es beneficiós o perjudicial és que l'expressió d'eNOS no es va alterar en les rates diabètiques, el que podria indicar que la situació basal de producció d'NO no es trobava suficientment alterada ja que en situacions greus com la insuficiència cardíaca l'expressió d'eNOS es troba marcadament reduïda [76], [114]. Un altre factor a tenir en compte, és que la inducció d'iNOS pot produir un augment de l'oxidació cel·lular [114] quan aquesta isoforma es

relaciona amb efectes deleteris i segons els nostres resultats (4-HNE i carbonils) no es va poder veure un increment de dany oxidatiu en cap grup experimental. . L'expressió de HIF-1 $\alpha$  està relacionada amb la capacitat de resposta enfront a la hipòxia activant la transcripció de gens relacionats amb l'angiogènesi, la diferenciació cel·lular i el metabolisme anaeròbic [115], [116]. L'increment de la seva expressió en les rates ovariectomitzades suposaria una major capacitat de resposta en el múscul cardíac d'aquest grup en comparació a les rates SHAM i OVA+E2. Per altra banda, alguns autors han posat de manifest que l'expressió de HIF-1 $\alpha$  està relacionada amb la capacitat de fer front a situacions d'isquèmia cardíaca i que la diabetis, degut a la major oxidació d'AG, impediria la resposta adaptativa de HIF-1 $\alpha$  enfront de la hipòxia i contribuiria negativament a la isquèmia cardíaca [117]. A més, s'ha vist que HIF-1 $\alpha$  i AKT regulen l'expressió gènica de diverses molècules entre elles iNOS [115] i, com s'ha vist abans, l'ovariectomia va produir tan un augment de l'expressió d'HIF1 $\alpha$  com de l'activació d'AKT i una millora en l'homeòstasi de la glucèmia. Per tant, de forma conjunta els nostres resultats suggereixen que l'ovariectomia, en les condicions estudiades, implicaria una millor capacitat de resposta front la hipòxia en el cor d'aquest grup, que podria ser deguda a una menor dependència de l'oxidació d'AG degut a la millor homeòstasi energètica d'aquest grup.

Tal i com s'ha comentant anteriorment, la diabetis és un factor de risc per al desenvolupament d'alteracions cardíques, que acaben repercutint en la funcionalitat del cor i augmenta el risc de patir MCV. Un dels principals factors implicats en la remodelació cardíaca en el cor diabètic és l'acumulació de fibres de col·lagen a la MEC que, sembla ser, és el principal promotor de la rigidesa del múscul cardíac i la disfunció diastòlica [16], [19], [75]. Els nostres resultats mostren clarament que les rates obesas i diabètiques varen presentar una MEC amb major expressió de marcadors de fibrosi cardíaca. Curiosament, les rates que van ser sotmeses a una ovariectomia bilateral varen mostrar una menor expressió

de fibres de col·lagen I i III, així com, una menor expressió del principal promotor de fibrosi tissular (TGF $\beta$ 1). La fibrosi cardíaca, durant la cardiomiopatia diabètica, s'ha relacionat amb la hiperglucèmia i la desregulació de la via PI3K/AKT [118]–[120]. Els nostres resultats es troben en línia amb aquestes investigacions ja que la menor glucèmia de les rates OVA es correlacionaria amb la major fosforilació d'AKT i una menor fibrosi observada en aquest grup. La resistència a la insulina s'ha vist associada a un augment de l'expressió de PAI-1 al cor [121], [122] i, per altra banda, hi ha evidències sobre la regulació recíproca de PAI-1 i TGF $\beta$ 1 i la seva contribució al desenvolupament de la fibrosi cardíaca [123], [124]. Per tant, tenint en compte la literatura al respecte, la major glucèmia i resistència a la insulina de les rates SHAM i OVA+E2 suposarien una situació lesiva que propiciaria la remodelació cardíaca i el desenvolupament de fibrosi per mitjà de PAI-1 i TGF $\beta$ 1. Per contra, la menor glucèmia i la major sensibilitat a la insulina de les rates OVA suposaria un menor risc de fibrosi cardíaca.

Per tal d'entendre millor els efectes produïts per les modificacions hormonals, vàrem estudiar la dotació dels diferents receptors ER $\alpha$ , ER $\beta$  i GPER en el cor dels diferents grups experimentals. Donada l'elevada atribució d'efectes cardioprotectors dels estrògens a nivell del receptor GPER tan *in vivo*, com *in vitro* i en humans [125]–[127], el fet de trobar una menor quantitat d'aquest receptor al cor de les rates OVA i OVA+E2, seria totalment compatible amb el perfil metabòlic i estructural més compromès que presenten les rates d'aquests grups. Per altra banda, l'increment de ER $\alpha$  i ER $\beta$  observat a les rates diabètiques (respecte les control sanes), podria contribuir a explicar els efectes deleteris dels estrògens en condicions de diabetat, tal i com, també indiquen altres estudis recents també realitzats a rates diabètiques, ovariectomitzades i tractades amb E2 que obtingueren resultats similars als nostres [86]. Per altra banda, en el cas de les rates ovariectomitzades tractades amb E2, si bé es cert que no tenen incrementats els nivells de ER $\alpha$  i ER $\beta$  sí tenen disminuïts els de GPER, el que podria

explicar el motiu pel qual en aquest grup alguns marcadors mostren un perfil menys lesiu que el de les rates control diabètiques. És interessant apuntar també la possibilitat de que el propi desenvolupament de la diabetat sigui la causa d'una alteració en l'expressió dels receptors ER $\alpha$ , ER $\beta$  i GPER i que els canvis en els receptors per l'ovariectomia, a nivell cardíac, siguin el resultat d'un efecte compensatori davant la menor producció d'estrògens en aquest grup. En aquest sentit, és molt important tenir en compte que en el nostre estudi treballem amb rates que en el moment de l'ovariectomia ja presenten un cert grau de diabetis i d'obesitat mentre que en els altres estudis, esmenats anteriorment, treballen amb rates sanes que desenvolupen una SMet com a resultat de la resecció dels ovaris. Aquest plantejament podria contribuir a explicar que una vegada s'ha desenvolupat un fenotip de diabetat i s'han alterat les dotacions de receptors, un tractament amb estrògens (com és fa en la THS) té efectes diferents i més perjudicials al tractament amb THS quan encara no s'ha desenvolupat un fenotip diabètic i, segons aquest plantejament, no s'haurien canviat les dotacions de receptors d'estrògens. De fet, en humans s'ha vist, a través de dos grans estudis prospectius aleatoritzats (WHI i ELITE) sobre la THS, que el moment en que aquesta s'inicia és clau per obtenir resultats favorables a nivell cardiovascular, el que s'ha anomenat *Timing Hypothesis*. Aquests estudis han posat de manifest que aquelles dones que inicien la THS abans o entre 5 i 10 anys després de la menopausa són les úniques que es beneficien dels efectes cardioprotectors d'aquests tipus de tractament [68] [69]. Així doncs, creiem que l'entorn metabòlic és clau per entendre la dualitat dels efectes dels estrògens, i en concret de l'E2, i que els estrògens podrien empitjorar els efectes cardiovasculars de la diabetat a través de canvis en la dotació del seus receptors induïts per la diabetat. En aquest aspecte, David et al. han vist que mentre que rates *wild-type* ovariectomitzades responen a l'E2 millorant l'homeòstasi de la glucosa, les rates ovariectomitzades i *knock-out* per a GPER no mostren millora, pel que els autors indiquen que GPER tindria un paper important en les accions de l'E2 en

l'homeòstasi de la glucosa [128]. En el nostre cas, el desenvolupament d'un estat obès i diabètic contribueix a una menor expressió de GPER a les rates SHAM (ja que l'única diferència entre LEAN i SHAM és el desenvolupament de diabetat) i aquest fet, tal i com indiquen Davis et al. podria explicar la pitjor homeòstasi de la glucèmia a aquests grups. Curiosament aquest perfil d'expressió inferior de GPER es replica al grup OVA+E2, fet que es podria relacionar amb la conjunció de diabetat i estrògens en ambdós grups (SHAM i OVA+E2), però no així al grup sotmès a una ovariectomia (OVA) que malgrat ser el grup amb el major pes corporal té un perfil de factors de risc cardiovascular menys deleteri. A la taula 12 es pot consultar un resum de les relacions que s'han comentat anteriorment.

Entorn metabòlic	Dotació receptors estrògens	Entorn hormonal	Risc cardiovascular
Rates sanes	$\alpha$ $\beta$ i GPER	Estrògens	Neutre
Rates diabètiques*	$\uparrow \alpha$ $\uparrow \beta$ $\downarrow$ GPER (SHAM)	Estrògens	$\uparrow\uparrow\uparrow$
	$\leftrightarrow \alpha$ $\leftrightarrow \beta$ $\leftrightarrow$ GPER (OVA)	-	$\uparrow$
	$\leftrightarrow \alpha$ $\leftrightarrow \beta$ $\downarrow$ GPER (OVA+E2)	17 $\beta$ -estradiol	$\uparrow\uparrow$

\*Les comparacions estan fetes en base a les rates sanes (LEAN)

**Taula 12. Taula resum entre la relació de l'entorn metabòlic i hormonal, la dotació d'estrògens i l'efecte sobre els risc cardiovascular**

Font: Elaboració pròpia

Els nostres resultats no són els únics en apuntar cap aquesta dualitat dels estrògens, altres autors ja han manifestat que l'edat a la qual les rates són sotmeses a l'ovariectomia és un punt clau per a que la privació d'estrògens tingui un efecte neutre o deleteri a nivell cardiovascular [129]. Altres estudis realitzats

amb rates diabètiques ovariectomitzades també han vist que l'E2 empitjora la disfunció del miocardi en aquest estat [86] i augmenta l'adhesió de leucòcits en venes cerebrals i l'estat inflamatori postisquèmic [88]. En un estudi comparatiu entre rates diabètiques d'ambdós sexes es va demostrar que les rates femella (no ovariectomitzades) tenien una progressió més ràpida de la cardiomiopatia que els mascles [87]. Per altra banda, també hi ha alguns estudis on han observat precisament el contrari que nosaltres, que la pèrdua d'estrògens a través de l'ovariectomia en rates diabètiques suposa un empitjorament dels paràmetres analitzats [130],[131]. Cal remarcar però que en el cas de l'article de S. H. Tawfik et al. les rates no desenvoluparen un fenotip tan diabètic com en el nostre treball i en l'article M. K. Fahmy et al. no varen observar canvis causats per l'ovariectomia en alguns paràmetres clau com la glucèmia en dejú o el test de sensibilitat a la insulina. Per tant, aquests resultats diferents podrien ser deguts a que en aquests articles les modificacions hormonals no s'estaven realitzant sobre rates tan diabètiques com les nostres i els seus resultats eren més similars als efectes de l'ovariectomia en rates sanes. Un altre factor a tenir en compte que diferencia el nostre treball de la resta de publicacions anteriors és la utilització d'un model animal que desenvolupa DM2 (caracteritzada per hiperinsulinèmia) enlloc d'un model de diabetis induït amb streptozotocina que condueix a un fenotip més similar a la *diabetis mellitus* de tipus 1 caracteritzat per hipoinsulinèmia. De fet, altres estudis realitzats amb la mateixa soca que nosaltres (ZDF) varen concloure que l'ovariectomia no causava un empitjorament significatiu de la glucèmia i que es podia prevenir amb la pràctica d'exercici físic [132]. Aquest article és força interessant perquè segons el que observen, la millora de l'entorn metabòlic a través de l'exercici físic produeix la reversió dels efectes deleteris dels estrògens, el que va en línia amb la nostra hipòtesi en la que els efectes deleteris dels estrògens depenen de les condicions metabòliques de fons.



En resum, els nostres resultats mostren que l'ovariectomia en rates obesas i diabètiques suposa una millora de la sensibilitat a la insulina i l'homeòstasi de combustibles al cor el que estaria relacionat amb una major flexibilitat metabòlica i una millor funció mitocondrial en aquest òrgan. La menor expressió de marcadors de fibrosi a nivell cardíac en aquest grup experimental juntament amb la millor resposta front la hipòxia probablement també suposi una millora en la capacitat funcional cardiovascular tal i com indiquen autors amb resultats similars als nostres. Tot plegat, els nostres resultats apunten a que els efectes deleteris cardiovasculars de les hormones sexuals femenines depenen de l'estat metabòlic i a que la diabetat també podria alterar la manera en que els estrògens regulen la dotació dels seus receptors al cor i alterar així els seus efectes cardioprotectors.

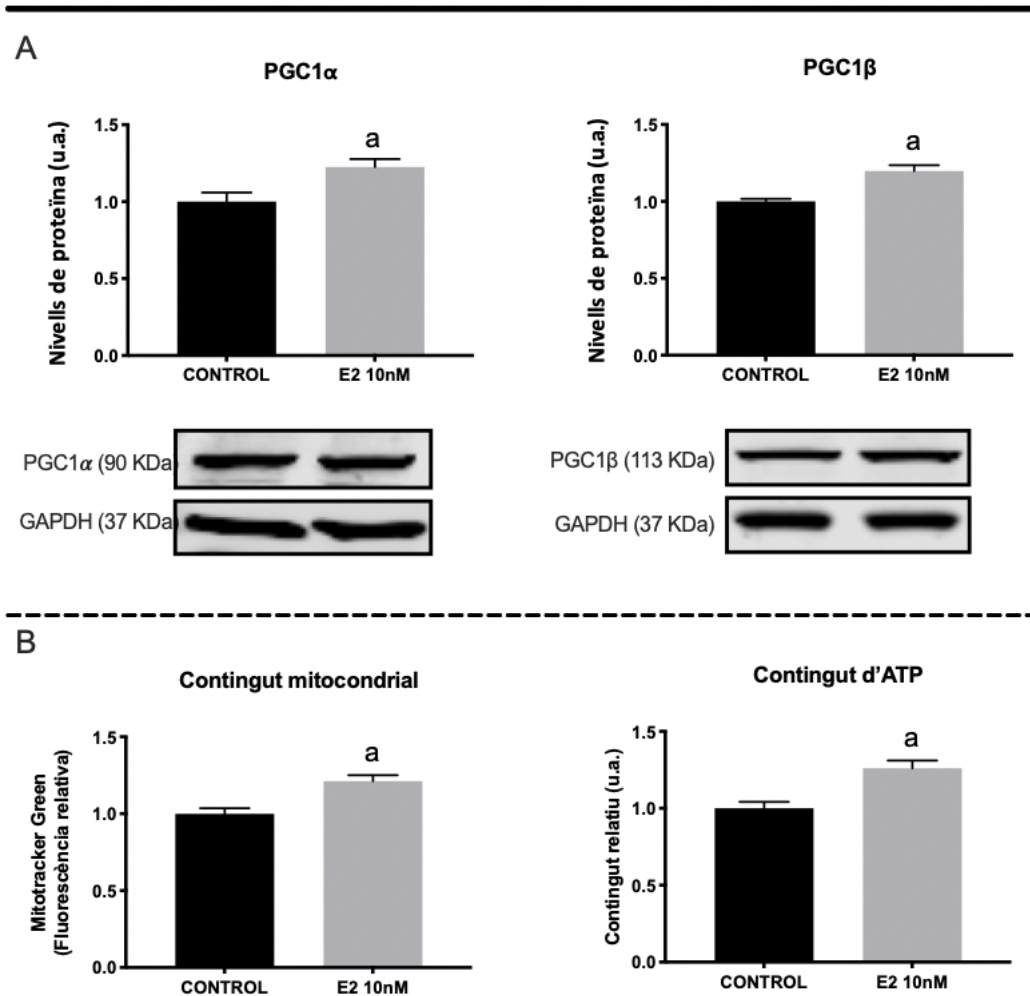
## **4.2 Efectes del 17 $\beta$ -estradiol en un model *in vitro* de lipotoxicitat cardíaca induïda amb palmitat**

L'objectiu d'aquesta sèrie d'experiments va ser estudiar si l'E2 modificava d'alguna forma els efectes lipotòxics del palmitat en cèl·lules cardíques per intentar explicar alguns dels efectes observats en el cor de les rates ZDF en les que tot indica que la manca d'hormones ovàriques redueix el dany del teixit cardíac en condicions de diabetis. Els experiments *in vitro* es varen realitzar amb una línia de cardiomioblasts provinents de rata neonata (H9c2) que es va sotmetre a diferents tractaments amb 17 $\beta$ -estradiol (E2), palmitat (PA) i ciclosporina A (CsA) per a determinar els seus efectes sobre la viabilitat, la producció de ROS i diferents marcadors mitocondrials, d'apoptosi i de la via de senyalització de la insulina.

### **4.2.1 Resultats**

#### **Efecte de l'estradiol sobre la biogènesi i funció mitocondrial i la producció d'ATP a H9c2**

Primerament, es van desenvolupar una sèrie de determinacions per comprovar l'efecte d'E2 a marcadors de biogènesi i funció mitocondrial. El tractament amb E2 va augmentar els nivells de PGC1 $\alpha$  i PGC1 $\beta$  (figura 20 A) i va anar acompanyat d'un increment del contingut mitocondrial (Mitotracker green<sup>®</sup>) i un augment en la producció d'ATP (figura 20 B).



**Figura 20. Efecte del 17 $\beta$ -estradiol sobre marcadors de biogènesi i contingut mitocondrial i producció d'ATP a H9c2.**

*A: nivells de proteïna normalitzats per GAPDH. B: dades relatives de fluorescència (Mitotracker Green) i bioluminescència (ATP). Els valors s'expressen com la mitjana  $\pm$  error estàndard ( $n = 6$ ). T-Student ( $p < 0,05$ ): a, E2 vs. Control.*

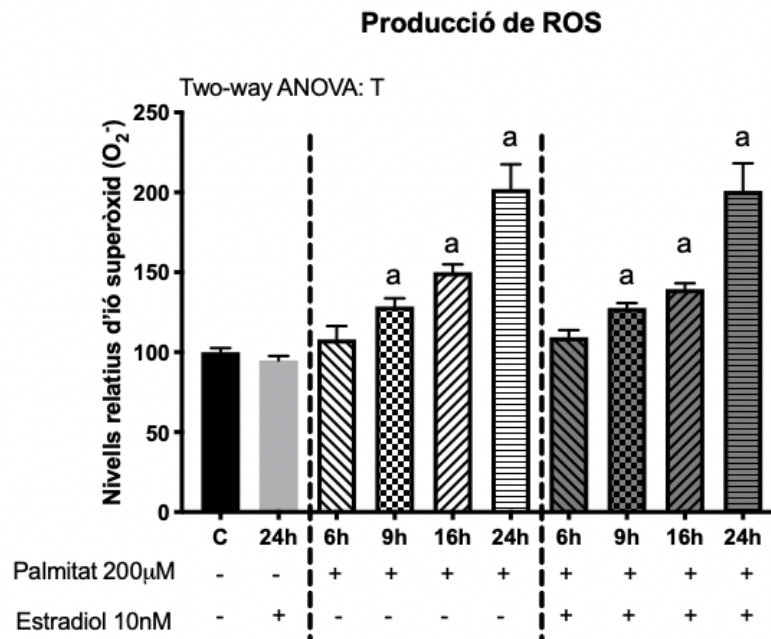
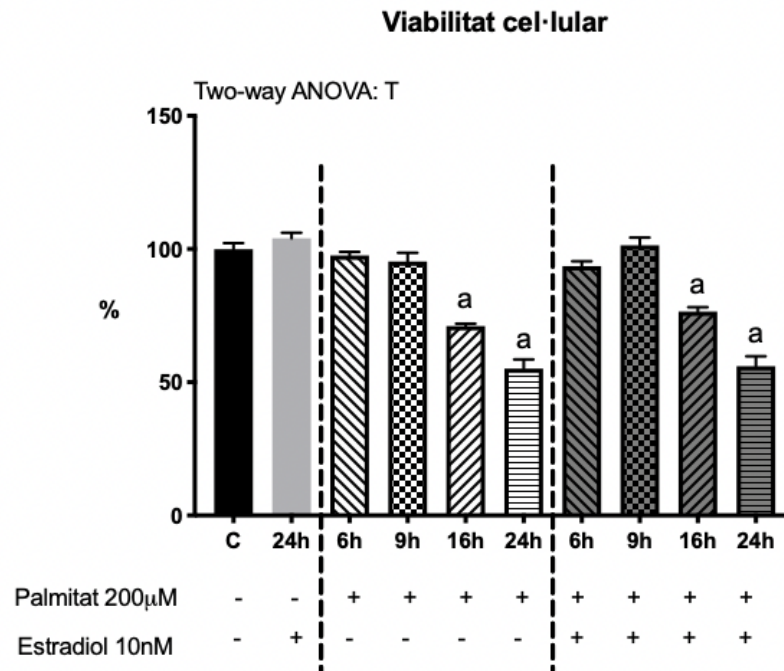
### **Efecte de l'estradiol i el palmitat sobre la viabilitat cel·lular i la producció de ROS a H9c2**

Inicialment, es va fer una bateria d'experiments amb diferents temps de tractament amb PA per poder avaluar els efectes sobre la mortalitat i la producció de ROS a curt i llarg termini. El tractament amb palmitat va mostrar una disminució de la viabilitat i un augment de la producció de ROS (concretament, ió superòxid) a mesura que augmentava el temps de tractament (figura 21). Amb

l'objectiu d'estudiar l'efecte de l'E2 en la resposta dels cardiomioblasts al PA, es va realitzar un pretractament de 24 hores amb E2 seguit d'un tractament combinat amb E2+PA de 6, 9, 16 i 24 hores. Tal i com es pot veure a la figura 21, l'E2 no va tenir cap efecte modificant els efectes produïts pel palmitat sobre la viabilitat i la producció de ROS.

### **Efecte del palmitat, l'estradiol i la ciclosporina A sobre la via de la insulina, la inflamació, l'apoptosi i la viabilitat cel·lular a H9c2**

Una vegada comprovats els efectes de l'E2 en la biogènesi i funció mitocondrial en les cèl·lules H9c2 i vist que els efectes del PA sobre la viabilitat i la producció de ROS no es varen veure alterats per l'exposició a l'E2, es varen analitzar amb més detall els possibles efectes de l'E2 sobre l'apoptosi i la inflamació en l'entorn de lipotoxicitat generat per al tractament amb PA. Per a aquesta sèrie d'experiments, es va utilitzar el temps d'exposició més curt de PA que mostrava alteracions (increment de ROS a 9 hores), amb l'objectiu de treballar en un estat primerenc de lipotoxicitat. Tal i com indiquen els nostres resultats, el PA va produir un important increment de l'escissió de la caspasa 3 (en anglès, cleaved caspase 3) i la fosforilació d'ERK, així com, una reducció de la fosforilació d'AKT induïda per E2 (figura 22 A). El tractament amb E2, en presència de PA, no va tenir cap efecte sobre aquests mateixos paràmetres (figura 22 A).

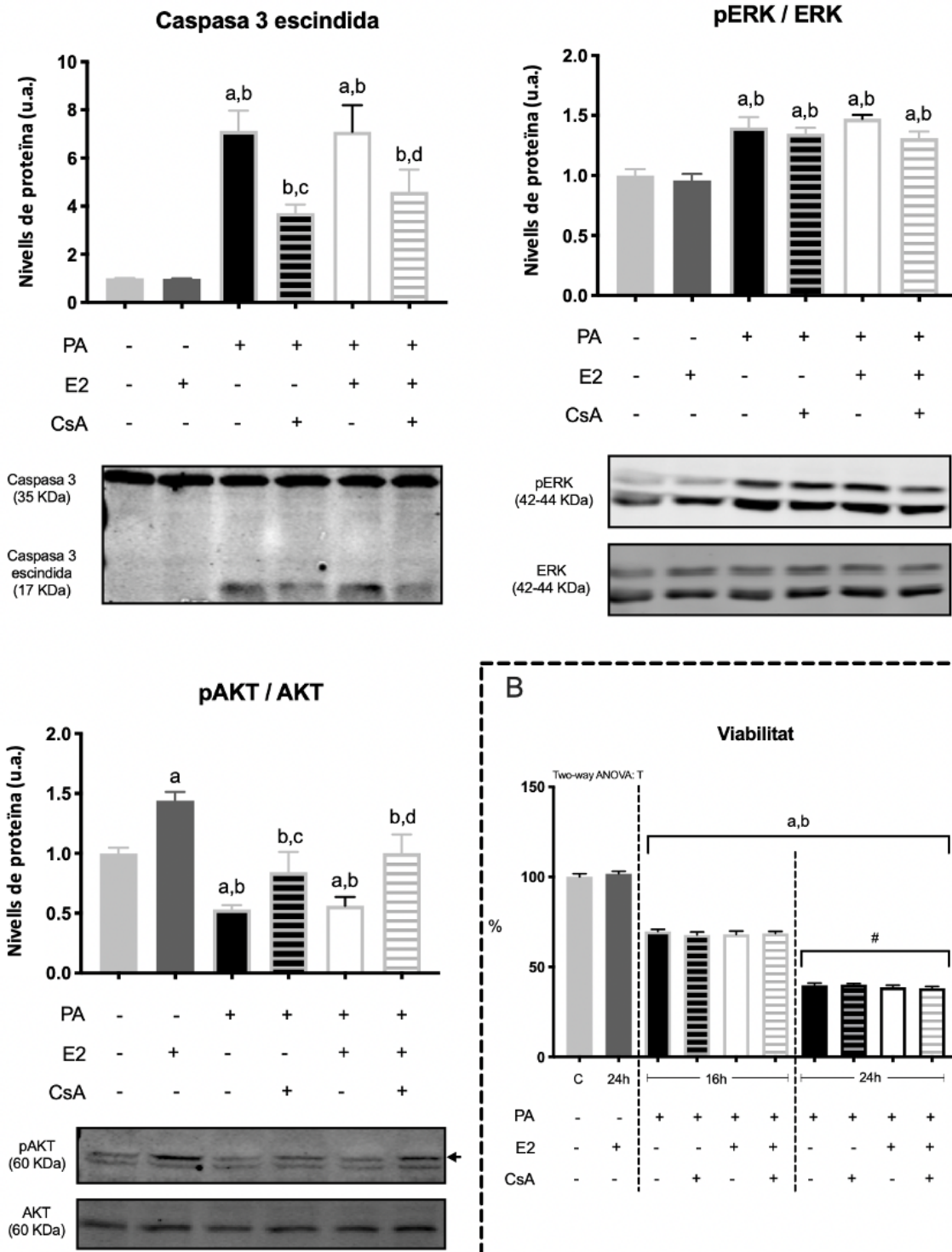


**Figura 21. Efecte del 17 $\beta$ -estradiol i el palmitat sobre la viabilitat cel·lular i producció de ROS a diferents temps a H9c2.**

*Dades relatives de fluorescència. Les H9c2 tractades amb palmitat + estradiol varen ser exposades prèviament a estradiol 10nM durant 24h. Els valors s'expressen com la mitjana  $\pm$  error estàndard (n= 12). Two-way ANOVA ( $p < 0,05$ ): T, efecte temps. Test post-hoc LSD de Fisher ( $p < 0,05$ ) a, diferències vs. control (C).*

Per esbrinar si l'activació de l'apoptosi per la via de la caspasa 3 es podia relacionar amb l'alliberació de citocrom c a través del porus de transició de permeabilitat mitocondrial (en anglès, mPTP), es va realitzar un tractament combinat de CsA + PA. CsA bloqueja l'obertura del l'mPTP i impedeix la sortida del citocrom C del mitocondri i, per tant, bloqueja l'activació de la cascada de les caspases. Així doncs, el tractament amb CsA va mostrar una reducció en l'escissió de la caspasa 3 i va incrementar el grau de fosforilació d'AKT en comparació als efectes produïts pel PA, però no es va veure efecte en l'activació d'ERK. Els grups tractats conjuntament amb CsA i E2 en condicions de lipotoxicitat (CsA+E2+PA) no mostraren diferències respecte aquells grups tractats únicament amb CsA (CsA+PA) en cap dels paràmetres estudiats. Pel que fa als efectes de CsA sobre la viabilitat, es va haver de treballar amb tractaments amb PA a 16 i a 24 hores ja que a 9 hores el PA no tenia efecte sobre la viabilitat. Els resultats obtinguts indiquen que el tractament amb CsA no va suposar cap variació en la viabilitat induïda per PA. Paral·lelament, es va estudiar si l'adició d'E2, juntament amb CsA, podria tenir algun efecte i es va realitzar un tractament triple (CsA+E2+PA) que tampoc va resultar en canvis en la viabilitat respecte el tractament amb CsA+PA a 16 i 24 hores.

A



**Figura 22. Efectes del 17β-estradiol, la ciclosporina i el palmitat sobre AKT, la inflamació i l'apoptosi (A) i la viabilitat cel·lular (B) a H9c2.**

PA: indica els tractaments amb palmitat 200μM. CsA: indica els tractaments amb ciclosporina A 1μM. E2: indica els tractaments amb 17β-estradiol 10nM. (A) Nivells de proteïna normalitzats per GAPDH. H9c2 tractades amb PA durant 9h. Els valors s'expressen com a mitjana ± error estàndard de dos experiments realitzats per triplicat (n= 6). One-way ANOVA (p<0,05). Test post-

*hoc LSD de Fisher: a, diferències vs. control; b, diferències vs. E2; c, diferències vs. PA; d, diferències vs. PA+E2. (B) Dades de fluorescència. H9c2 tractades amb PA durant 16 i 24h. Els valors s'expressen com la mitjana  $\pm$  error estàndard (n= 12). Two-way ANOVA (p<0,05): T, efecte temps. Test post-hoc LSD de Fisher (p<0,05): a, diferències vs. control; b, diferències vs. E2; #, diferències 24h vs. 16h.*

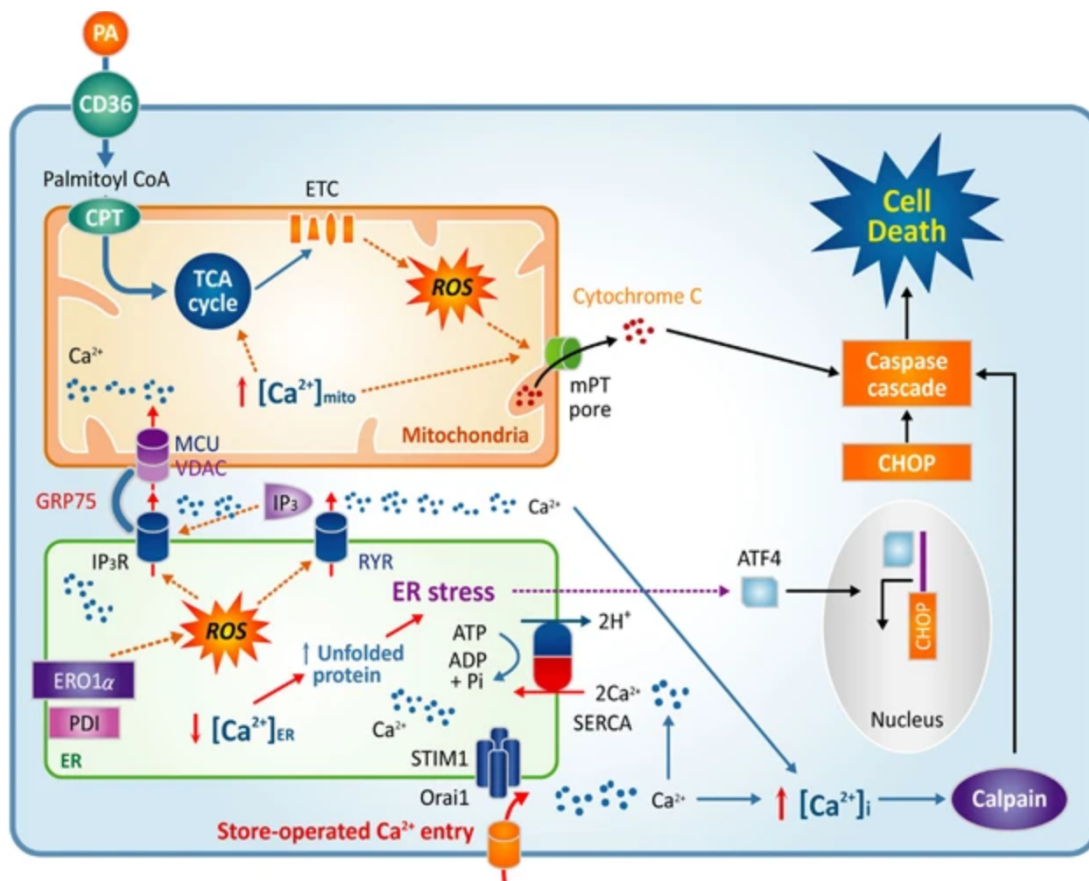
#### 4.2.2 Discussió

S'ha demostrat que la DM2 i l'obesitat (situació combinada coneguda com diabetesitat) tenen un impacte sobre el desenvolupament de les MCV i suposen la principal causa de mort en aquest grup de població [3]. L'origen de les MCV en la diabetesitat es multifactorial però a nivell metabòlic, l'acumulació ectòpica de greix al cor juntament amb la resistència a la insulina són les principals causes de la desregulació metabòlica i funcional que pateix aquest òrgan. Ambdues situacions indueixen una major captació i oxidació d'àcids grassos en detriment del consum de glucosa que, juntament, amb l'acumulació de derivats tòxics de lípids en el teixit cardíac [133], [134], acaben incrementant la producció de radicals lliures, activant vies apoptòtiques i modificant la matriu extracel·lular, entre d'altres, la qual cosa acaba provocant la pèrdua de funcionalitat del cor [75], [135], [136]. Concretament, la toxicitat s'ha associat a certes espècies lipídiques com el diacilglicerol i les ceramides que estarien involucrades, entre d'altres, amb la desregulació de la via de la insulina i de la funció mitocondrial [3]–[5]. Donada la importància que té la correcta senyalització de la via de la insulina a nivell cardíac, així com també, la biogènesi i funció mitocondrials en el desenvolupament de les complicacions cardíques durant la diabetesitat, el present treball es va centrar en esbrinar quina era la resposta enfront el tractament amb E2 en condicions de lipotoxicitat.

El resultat corresponent a la contingut mitocondrial i al contingut d'ATP (figura 20 B) demostren els efectes directes que té l'E2 incrementant la biogènesi i la funció mitocondrial en cardiomioblasts H9c2 i complementen estudis anteriors del grup que apunten a una major diferenciació mitocondrial al teixit cardíac de rates femella [55], [140]. La biogènesi, la dinàmica i la funció mitocondrials són



processos molt condicionats per la regulació transcripcional a través de PPAR $\alpha/\beta/\gamma$  i els seus coactivadors PGC1 $\alpha/\beta$  [141], [142]. Per tant, l'augment del contingut de proteïna de PGC1 $\alpha$  i PGC1 $\beta$  es relacionaria positivament amb l'increment de la contingut mitocondrial i la major producció d'ATP observats en el nostre estudi.



**Figura 23. Mecanismes de toxicitat cel·lular del palmitat.**

A la figura s'observa com el palmitat (PA) entra a la cèl·lula per mitjà de CD36 i la seva oxidació al mitocondri produeix ROS i alteracions en els fluxos de calci que acaben provocant la formació del porus de membrana mitocondrial (mPTP) el que condueix a la sortida del citocrom C i a l'activació de la cascada de les caspases. Font: *Oxidative stress and calcium dysregulation by palmitate in type 2 diabetes.* (2017) [136]

L'ús de PA per a induir una situació lipotòxica en cèl·lules H9c2 està àmpliament descrit en la bibliografia i està associat a un augment de la producció de ROS, inflamació, apoptosi, estrès al reticle endoplasmàtic i mort cel·lular [125], [143]–[146]. Els resultats obtinguts mostren l'efecte del PA sobre la viabilitat cel·lular a mesura que incrementa el temps d'exposició al PA a partir de les 16h. A la figura

23 es poden observar els diferents mecanismes que s'han descrit en relació a la toxicitat associada al PA. Com es pot apreciar, hi destaquen els principals orgànuls afectats, el reticle endoplasmàtic i el mitocondri, així com altres agents implicats en la disfunció mitocondrial que varen ser estudiats en aquest capítol com l'mPTP, les ROS i la via de las caspases.

Els nostres resultats mostren que durant les primeres 9h de tractament amb PA, la viabilitat cel·lular no es veu compromesa però la producció de ROS està augmentada i també s'ha iniciat l'apoptosi (increment de l'escissió de la caspasa 3), la qual cosa posa de manifest el paper iniciador de la disfunció mitocondrial en la toxicitat del PA, tal i com també indiquen altres autors [143], [147]. El tractament amb E2 no va suposar cap tipus d'efecte en la viabilitat el que, de forma general, ens fa pensar que l'E2 no tindria la capacitat de protegir les H9C2 front la toxicitat produïda pel PA en les condicions experimentals utilitzades i sobre els paràmetres determinats. De forma més detallada, veiem que podria ser degut a que l'E2 no té efectes sobre AKT, ERK ni la caspasa 3 en condicions de lipotoxicitat. No obstant això, en altres condicions (inflamació induïda amb TNF $\alpha$  o hipòxia) sí que s'ha vist un efecte beneficiós de l'E2 en termes d'apoptosi i mort cel·lular [148], [149]. S'ha descrit en diferents tipus cel·lulars que el PA pot actuar directament sobre la membrana mitocondrial afavorint l'obertura de l'mPTP [150], [151]. Aquest porus altera la permeabilitat de la membrana mitocondrial i permet la sortida de molècules de petit tamany com el citocrom c, que induiria l'activació de la via intrínseca de l'apoptosi (via mitocondrial intrínseca) que desencadena l'activació de la caspasa 3. Per tal d'esbrinar si els efectes del PA sobre la mortalitat estarien associats principalment a l'obertura de l'mPTP es varen exposar les cèl·lules a la CsA, un bloquejador de la formació de l'mPTP. Els resultats obtinguts, posen de manifest que, malgrat la presència del PA al medi de cultiu, el bloqueig del porus disminueix l'activació de la caspasa 3 i s'acompanya d'un increment en la fosforilació de l'AKT, la qual cosa suggereix

una menor afectació de la via PI3K/AKT/mTOR relacionada amb la supervivència cel·lular, l'angiogènesi, la regulació del metabolisme glucídic i la relaxació de l'endoteli vascular, entre d'altres [152]. Segons alguns autors, l'efecte de CsA sobre la major fosforilació d'AKT podria ser degut a la supressió de PTEN, que és un repressor de l'activació d'AKT [153]. No obstant, l'activació d'ERK, una cinasa (MAPK) implicada en processos d'inflamació, no va sofrir cap canvi amb el tractament amb CsA, la qual cosa indicaria que l'activació d'aquesta via, a priori, és independent de l'mPTP i de l'AKT. Així doncs, sembla que els nostres resultats indiquen que el PA actuaria promovent la formació de l'mPTP però, no seria l'únic element implicat en la activació de la caspasa 3. Probablement, la via extrínseca (independent de citocrom c) i altres vies proapoptòtiques també estiguin activades i per això no s'aconsegueix una reducció total de l'activació d'aquesta caspasa. Per exemple, s'ha vist que l'apoptosi induïda per PA pot tenir origen en l'estrès causat al reticle endoplasmàtic [138], [146]. A més, tractaments més perllongats de PA conjuntament amb CsA tampoc varen resultar amb una menor mortalitat, el que recolza el fet de que la toxicitat del PA sigui deguda a diferents causes ja que els efectes de la CsA sobre l'activació de la caspasa 3 i sobre AKT observats a 9h, no són suficients per contrarestar els seus efectes sobre la mortalitat ni formació de ROS a 16 i 24h. En alguns teixits, com el cervell, s'ha descrit que l'E2, a través del receptor d'estrògens ER $\beta$ , podria modular la sensibilitat a la CsA [154]. Per aquest motiu, també es va realitzar un tractament conjunt per a determinar un possible efecte interactiu entre CsA i E2 en presència de PA (CsA+E2+PA). El resultat obtingut amb aquest tractament combinat no va ser diferent al dels tractaments per separat en condicions de lipotoxicitat, la qual cosa indica que l'E2 no té capacitat per modular els efectes de CsA en aquestes condicions.

En resum, els nostres resultats reafirmen *in vitro* l'efecte de l'E2 promovent la biogènesi i la funció mitocondrial a cardiomiocits, probablement, a través de

l'increment de co-activadors transcripcionals com PGC1 $\alpha$  i PGC1 $\beta$ . També observam que l'E2 activa la cinasa AKT, que pertany a la via PI3K/AKT/mTOR el que es relacionaria amb la supervivència cel·lular mitjançant la regulació de l'apoptosi/autofàgia, amb la sensibilitat a la insulina i, de forma més específica, amb la cardioprotecció [152], [155]. Per altra banda, en condicions de lipotoxicitat, els efectes de l'E2 sobre la biogènesi i funció mitocondrials en cardiomioblasts H9c2 són neutralitzats completament i no poden contrarestar els efectes pro-oxidants i proapoptòtics del PA. D'aquesta manera, es conclou que l'E2, en les condicions utilitzades, no suposa cap protecció front la toxicitat induïda pel PA en els paràmetres estudiats.

### **4.3 Efectes de les hormones sexuals femenines en el desenvolupament de la disfunció endotelial en un model murí de diabetis**

L'objectiu del present treball es estudiar l'efecte de les hormones sexuals femenines, i en concret l'estradiol, sobre marcadors de disfunció endotelial en un model de diabetis i obesitat. De forma resumida, en aquest apartat s'analitzen dades d'expressió en aorta de gens relacionats amb el to vascular, la inflamació, l'adhesió cel·lular, la fibrosi, la hipòxia, l'angiogènesi i la funció mitocondrial. Les aortes provenen de les mateixes rates descrites a l'apartat 4.1.

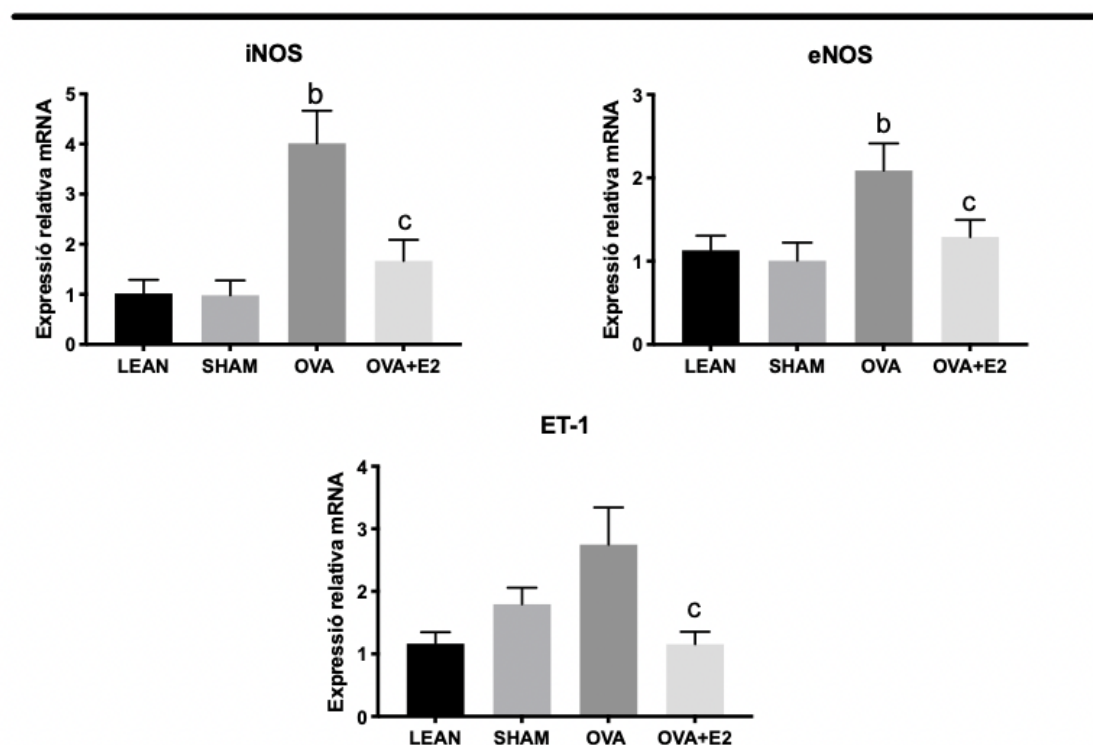
#### **4.3.1 Resultats**

##### **Efecte de l'ovariectomia i l'administració d'E2 sobre elements reguladors del to vascular a l'aorta**

La disfunció endotelial altera la capacitat de l'endoteli per a mantenir una adequada regulació del to vascular. En aquest sentit l'estudi de molècules implicades en la regulació de la vasodilatació i la vasoconstricció és clau per estudiar l'estat de l'endoteli i poder determinar les possibles implicacions a nivell fisiològic. Les rates del grup OVA mostraren una major expressió dels enzims implicats en la síntesi de molècules amb capacitat de vasodilatació com l'òxid nítric, iNOS i eNOS, respecte les rates SHAM i el tractament amb E2 va revertir completament l'efecte de l'ovariectomia. Per altra banda, els resultats sobre l'expressió de endotelina-1 (ET-1), un potent vasoconstrictor, varen indicar un perfil similar, encara que l'increment, en les rates OVA, no va ser significatiu (figura 24 ).

## Efecte de l'ovariectomia i l'administració d'E2 sobre la remodelació vascular i marcadors de fibrosi a l'aorta

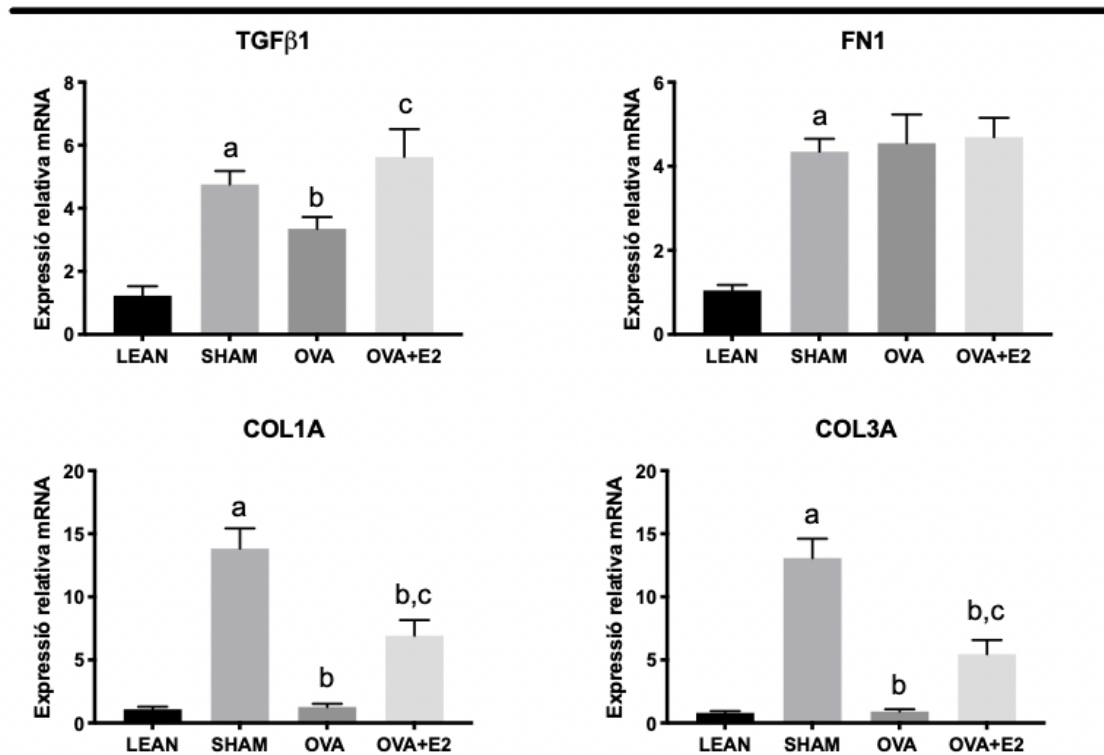
L'increment de la rigidesa vascular per mitjà de la modificació de la composició de la matriu extracel·lular també compromet la funcionalitat de l'endoteli i és una característica important de la disfunció vascular. Com es pot observar a la figura 25, les rates SHAM, en comparació a les rates LEAN, varen mostrar una major expressió del principal marcador de fibrosi (TGF $\beta$ 1) i elements relacionats amb la remodelació de la matriu extracel·lular com fibronectina (FN1) i les fibres de col·lagen I i III (COL1A i COL3A). Entre el grup de rates fa/fa es va observar que l'ovariectomia va reduir l'expressió del TGF $\beta$ 1, COL1A i COL3A i que el tractament amb E2 va incrementar-ne l'expressió de forma significativa. En el cas de TGF $\beta$ 1 l'expressió induïda per E2 va ser similar a la del grup SHAM, però en els gens COL1A i COL3A va ser estadísticament inferior.



**Figura 24.** Efecte de l'ovariectomia i l'administració d'E2 sobre elements reguladors del vascular a l'aorta de rates femella ZDF.

Nivells d'expressió de mRNA normalitzats per GAPDH. LEAN, rates control sanes; SHAM, rates sotmeses a cirurgia simulada; OVA, rates ovariectomitzades; OVA+E2, rates ovariectomitzades

tractades amb  $17\beta$ -estradiol. Els valors s'expressen com a mitjana  $\pm$  error estàndard de 8 animals per grup. T-Student ( $p < 0,05$ ) a, SHAM vs. LEAN. One-way ANOVA ( $p < 0,05$ ). Test post-hoc LSD de Fisher ( $p < 0,05$ ): b, diferències vs. SHAM, c, diferències vs. OVA.



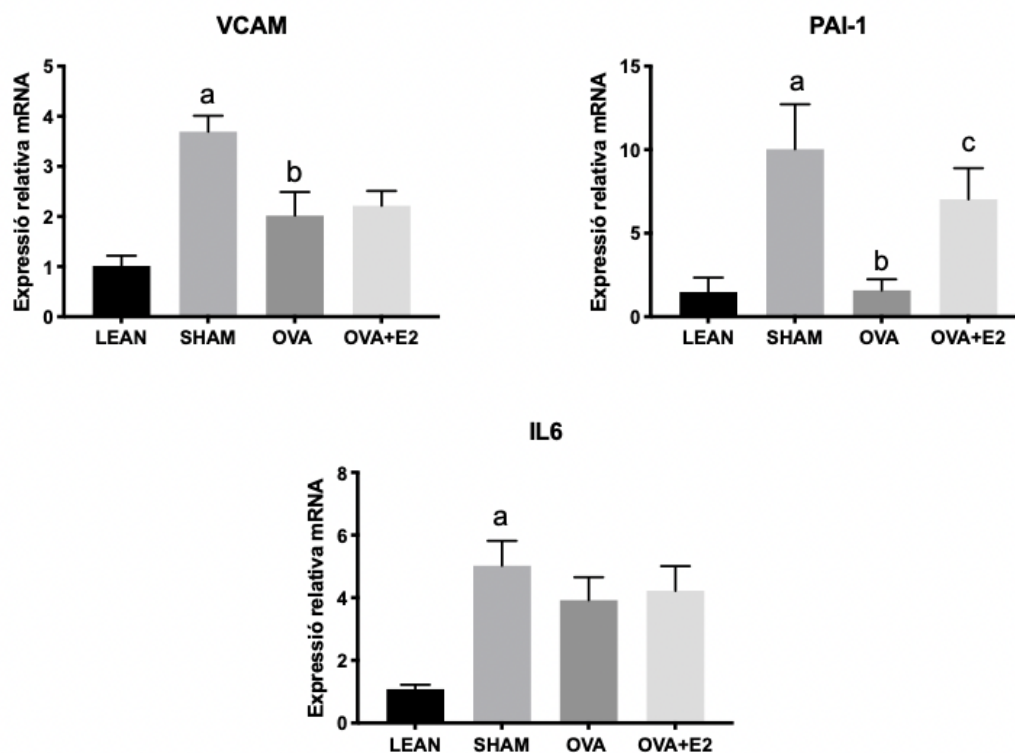
**Figura 25. Efecte de l'ovariectomia i l'administració d'E2 sobre elements implicats en la remodelació vascular i la fibrosi a l'aorta de rates femelles ZDF.**

Nivells d'expressió de mRNA normalitzats per GAPDH. LEAN, rates control sanes; SHAM, rates sotmeses a cirurgia simulada; OVA, rates ovariectomitzades; OVA+E2, rates ovariectomitzades tractades amb  $17\beta$ -estradiol. Els valors s'expressen com a mitjana  $\pm$  error estàndard de 8 animals per grup. T-Student ( $p < 0,05$ ) a, SHAM vs. LEAN. One-way ANOVA ( $p < 0,05$ ). Test post-hoc LSD de Fisher ( $p < 0,05$ ): b, diferències vs. SHAM; c, diferències vs. OVA.

### Efecte de l'ovariectomia i l'administració d'E2 sobre marcadors de disfunció endotelial i inflamació a l'aorta

Les alteracions produïdes a l'endoteli durant la progressió de la malaltia vascular condueixen a la síntesi de molècules que alteren la permeabilitat i afavoreixen l'adhesió de cèl·lules inflamatòries que contribueixen a la pròpia progressió de la disfunció endotelial. El nostre estudi de la disfunció endotelial i la inflamació a l'aorta es va realitzar mitjançant la determinació de l'expressió de la molècula d'adhesió vascular VCAM (àmpliament estudiada pel seu efecte facilitador de

l'adhesió de cèl·lules inflamatòries a l'endoteli), l'inhibidor de l'activador de plasminògen PAI-1 (amb coneguts efectes proinflamatoris i protrombòtics en el procés d'aterosclerosi) i la interleucina pro-inflamatòria IL6. Els nostres resultats, il·lustrats a la figura 26, indiquen que les rates SHAM varen mostrar un perfil d'expressió incrementat dels tres marcadors anomenats respecte les rates LEAN. Pel que fa als efectes promoguts per l'ovariectomia, es va observar que les rates OVA varen presentar una menor expressió de VCAM i PAI-1 que les rates SHAM. Per altra banda, el tractament amb E2 va revertir l'efecte de l'ovariectomia només en el cas de PAI-1. L'expressió de IL6 va romandre inalterada en els grups OVA i OVA+E2 en comparació al grup SHAM.



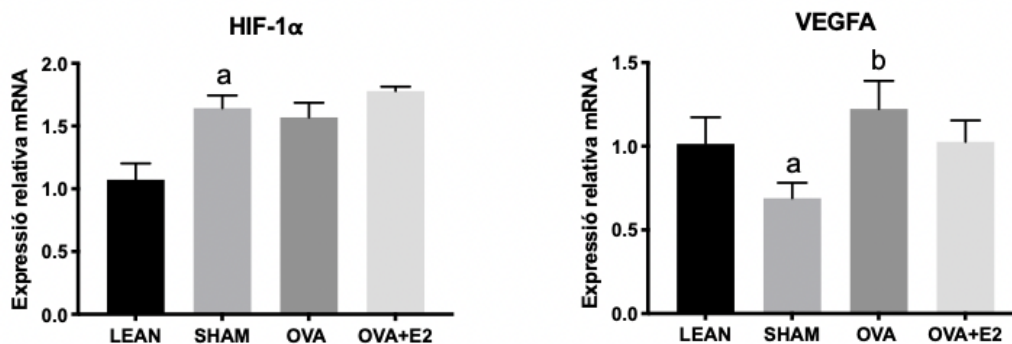
**Figura 26. Efecte de l'ovariectomia i l'administració d'E2 sobre marcadors de disfunció endotelial i inflamació a l'aorta de rates femella ZDF.**

Nivells d'expressió de mRNA normalitzats per GAPDH. LEAN, rates control sanes; SHAM, rates sotmeses a cirurgia simulada; OVA, rates ovariectomitzades; OVA+E2, rates ovariectomitzades tractades amb  $17\beta$ -estradiol. Els valors s'expressen com a mitjana  $\pm$  error estàndard de 8 animals per grup. T-Student ( $p < 0,05$ ), a, SHAM vs. LEAN. One-way ANOVA ( $p < 0,05$ ). Test post-hoc LSD de Fisher ( $p < 0,05$ ): b, diferències vs. SHAM; c, diferències vs. OVA.



## Efecte de l'ovariectomia i l'administració d'E2 sobre marcadors d'hipòxia i angiogènesi a l'aorta

La capacitat de resposta del teixit vascular front la hipòxia i la capacitat d'angiogènesi d'aquest són considerats elements claus en la funcionalitat de l'endoteli ja que pot comprometre l'aportació de nutrients o oxigen al teixits i òrgans en situacions d'estrès. Per aquest motiu l'estudi de marcadors d'hipòxia i angiogènesi a l'aorta és un factor més a tenir en compte per a determinar la capacitat de resposta de l'endoteli en aquest teixit. La seva interpretació és complexa ja que, com s'explica més endavant, s'han observat funcions diverses i oposades en funció del teixit estudiat. L'expressió del factor induïble per hipòxia HIF-1 $\alpha$  es va trobar augmentada per igual en els tres grups fa/fa, mentre que, l'expressió del factor pro-angiogènesis VEGFA estava disminuïda en el grup SHAM en comparació al grup LEAN i va ser augmentada per l'ovariectomia (figura 27).

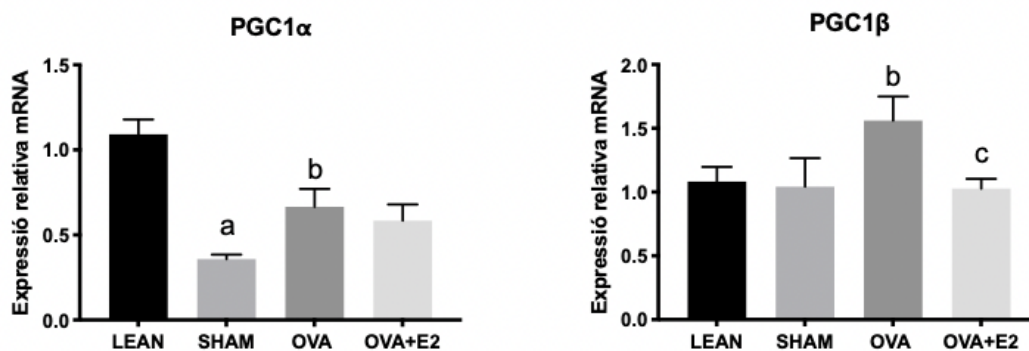


**Figura 27.** Efecte de l'ovariectomia i l'administració d'E2 sobre marcadors d'hipòxia i angiogènesi a l'aorta de rates femella ZDF.

Nivells d'expressió de mRNA normalitzats per GAPDH. LEAN, rates control sanes; SHAM, rates sotmeses a cirurgia simulada; OVA, rates ovariectomitzades; OVA+E2, rates ovariectomitzades tractades amb 17 $\beta$ -estradiol. Els valors s'expressen com a mitjana  $\pm$  error estàndard de 8 animals per grup. T-Student ( $p < 0,05$ ) a, SHAM vs. LEAN. One-way ANOVA ( $p < 0,05$ ). Test post-hoc LSD de Fisher ( $p < 0,05$ ): b, diferències vs. SHAM; c, diferències vs. OVA.

## Efecte de l'ovariectomia i l'administració d'E2 sobre marcadors biogènesi mitocondrial a l'aorta

Es sabut que la funció mitocondrial es troba alterada en nombroses malalties, entre elles la diabetis i l'obesitat. Els coactivadors transcripcionals de PPAR $\gamma$  es consideren uns dels principals reguladors de la biogènesi i la funció mitocondrial, per aquest motiu, vàrem voler estudiar les possibles alteracions en aquests marcadors. A la figura 28, es mostra l'expressió dels principals coactivadors transcripcionals de PPAR $\gamma$ , la seva anàlisi va indicar que l'expressió de PGC1 $\alpha$ , però no la de PGC1 $\beta$ , es va veure disminuïda en el grup SHAM en comparació al grup LEAN. Per altra banda, l'ovariectomia va provocar un augment de l'expressió de PGC1 $\alpha$  i PGC1 $\beta$ , que en el cas de PGC1 $\beta$ , va ser revertit pel tractament amb E2.



**Figura 28. Efecte de l'ovariectomia i l'administració d'E2 sobre co-activadors transcripcionals de PPAR $\gamma$  a l'aorta de rates femella ZDF.**

Nivells d'expressió de mRNA normalitzats per GAPDH. LEAN, rates control sanes; SHAM, rates sotmeses a cirurgia simulada; OVA, rates ovariectomitzades; OVA+E2, rates ovariectomitzades tractades amb 17 $\beta$ -estradiol; els valors s'expressen com a mitjana  $\pm$  error estàndard de 8 animals per grup. T-Student ( $p < 0,05$ ) a, SHAM vs. LEAN. One-way ANOVA ( $p < 0,05$ ). Test post-hoc LSD de Fisher ( $p < 0,05$ ): b, diferències vs. SHAM; c, diferències vs. OVA.

### 4.3.2 Discussió

La diabetes i l'obesitat són dues patologies fortament relacionades amb la disfunció endotelial [156]. L'homeòstasi en la producció d'òxid nítric és un punt clau pel manteniment de la funció endotelial i està condicionada per nombrosos factors com l'estrès oxidatiu, la inflamació o la resistència a la insulina que produeixen alteracions a l'eix PI3K/AKT/eNOS [157]. De fet, s'ha observat que un

tractament curt amb insulina a rates diabètiques suposa una sobreexpressió d'eNOS i un increment en la producció d'òxid nítric [158], la qual cosa revela la importància de la sensibilitat a la insulina en el manteniment del to endotelial. Els nostres resultats mostren que entre les rates fa/fa, aquells grups amb una major glucèmia i major resistència sistèmica la insulina (SHAM i OVA+E2) també presenten una menor expressió d'eNOS i d'iNOS i que el grup OVA, amb un millor perfil glucèmic i menor resistència a la insulina, manifesta una major expressió d'aquests gens. Per altra banda, també s'ha vist que l'expressió d'eNOS està controlada a nivell mitocondrial per PGC1 $\alpha$  [159]. Així doncs, la major expressió de PGC1 $\alpha$  i PGC1 $\beta$  observada en les rates OVA podria ser la causa de la major expressió d'eNOS en aquest mateix grup. Pel manteniment del to vascular, no només és important la producció d'òxid nítric, altres molècules vasoactives com l'ET-1, que és un potent vasoconstrictor, també tenen un important paper en processos patològics cardíacs, càncer i malalties neurodegeneratives [160]. Alguns autors han posat de manifest l'efecte inhibitori de l'estradiol sobre l'expressió de ET-1 en cèl·lules endotelials coronaries [161], [162], el que podria contribuir a explicar la menor expressió d'ET-1 en el grup OVA+E2 en comparació al grup OVA. No obstant, la depleció hormonal produïda per la ovariectomia, tot i incrementar l'expressió d'ET-1 respecte les SHAM, no va arribar a ser significatiu. Un altre dels punts claus per a la correcta homeòstasi vascular és la regulació de la capacitat angiogènica a través de factors induïts per hipòxia com HIF1 $\alpha$  i del regulador de l'angiogènesi VEGFA. En situacions com l'obesitat i la diabetis es produeix una alteració amb l'arribada d'oxigen als teixits el que indueix un estat d'hipòxia cel·lular i les respostes depenen del tipus de teixit o òrgan. A nivell cardiovascular, l'expressió de HIF-1 $\alpha$  està relacionada amb un efecte compensatori de l'endoteli per fer front a la hipòxia i la seva expressió es creu que té un paper protector [163]. No obstant això, en altres teixits com la retina, sembla que l'expressió de HIF-1 $\alpha$  suposaria resposta adaptativa perjudicial a la hipòxia sobrevinguda durant la diabetis i acabaria sent la principal causa de la

retinopatia diabètica [164]. Els nostres resultats sobre l'expressió de HIF-1 $\alpha$  mostren un increment de l'expressió en les aortes de les rates fa/fa sense diferències entre els tractaments, el que indicaria que l'estat diabèsic suposa un increment d'aquest element però la manipulació hormonal no indueix canvis en HIF-1 $\alpha$ . Per obtenir una resposta més completa sobre els efectes de l'entorn hormonal en condicions de diabetat hem d'estudiar els efectes en el principal regulador de l'angiogènesi. VEGFA és un potent inductor de l'angiogènesi que a més està estretament relacionat amb la inducció d'eNOS [158]. Per tant, l'increment en l'expressió de VEGFA a les rates ovariectomitzades, respecte el grup SHAM, suggereix una major capacitat angiogènica en aquest grup. A més, s'ha vist que l'expressió de VEGFA té un efecte directe, no només sobre la angiogènesi, sinó també sobre la relaxació vascular [158]. Tal com passa amb HIF-1 $\alpha$ , les accions de VEGFA poden ser oposades en funció del teixit. A nivell cardiovascular, una major expressió de VEGFA és beneficiosa per prevenir la hipòxia cardíaca causada per la DM2 [158], [165], però a la retina i als ronyons una excessiva expressió de VEGFA és la causa principal de la retinopatia [166] i la nefropatia diabètica [167], respectivament. Per contra, a nivell de la vasculatura perifèrica una menor expressió de VEGFA està relacionada amb el peu diabètic i les dificultats per curar ferides [168]. Tot plegat, els nostres resultats a l'aorta, semblen indicar que les rates OVA presenten una major capacitat angiogènica que les rates SHAM i OVA+E2 i, en l'entorn cardiovascular, es relacionaria amb un procés adaptatiu beneficiós .

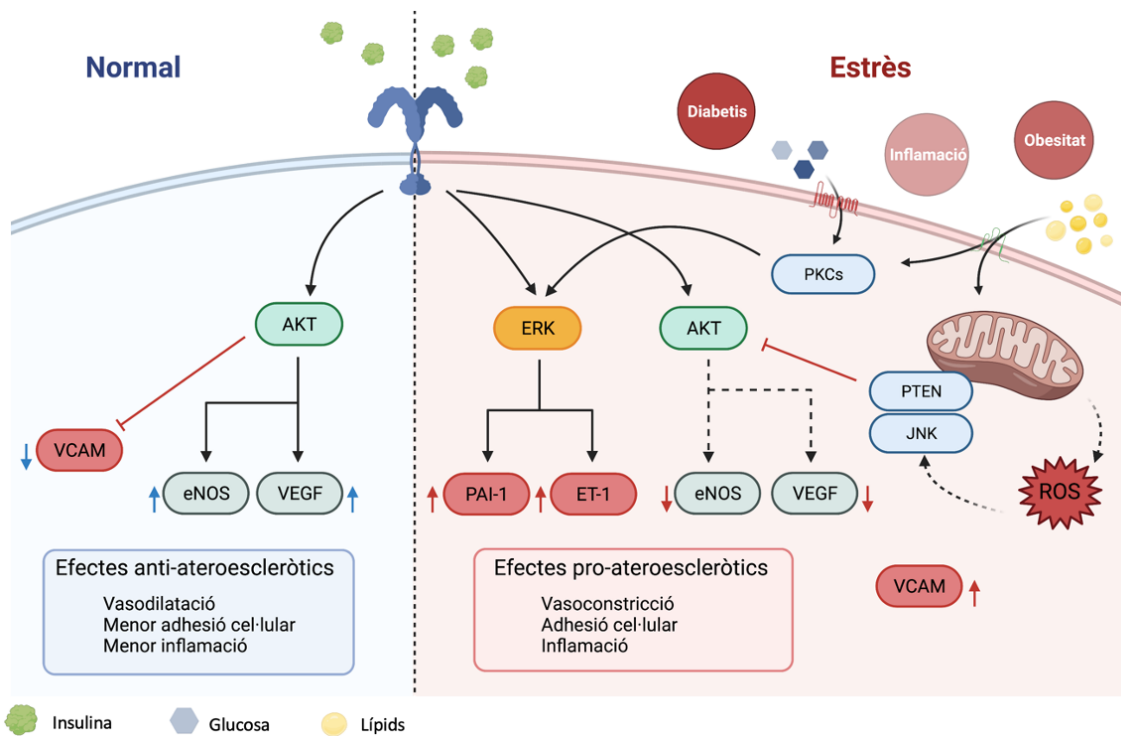
Una vegada analitzat l'efecte de la diabetat i l'entorn hormonal sobre el manteniment del to vascular i la capacitat angiogènica és important parlar sobre un altre aspecte de la disfunció endotelial que es troba directament relacionat amb la patogènia vascular. En situacions com la diabetis i la obesitat incrementa el risc de lesions endotelials que acaben amb la formació de plaques d'ateroma i trombes o aneurismes [169]. L'expressió de PAI-1 i VCAM a l'endoteli vascular,

està directament relacionada amb la DM2 [76] i ambdues molècules tenen un important paper en el desenvolupament de la disfunció endotelial i de la placa d'ateroma. Per consegüent, la menor expressió de PAI-1 i VCAM a les rates OVA podria ser explicada per la millor homeòstasi de la glucèmia que presenten. De la mateixa manera, el tractament amb E2, que va suposar un increment de la glucèmia i de la resistència a la insulina, es va veure acompanyat d'un increment en l'expressió de PAI-1. A més, altres grups han confirmat que la millora farmacològica de la glucèmia en rates diabètiques produeix una reducció en l'expressió de VCAM [170]. Per altra banda, també s'ha vist que l'expressió de PAI-1 [76] i VCAM [171] està reprimida per l'òxid nítric. Llavors, la menor expressió de PAI-1 i VCAM en el grup OVA podria obeir a una major producció d'òxid nítric, tal i com suggereix l'increment de l'expressió d'eNOS en aquest grup que, tal i com s'ha indicat anteriorment, podria ser una conseqüència de les diferències entre grups pel que fa a l'homeòstasi glucèmica. No obstant, és important indicar que el tractament amb E2, tot i que va induir un increment de la glucèmia i va disminuir l'expressió d'eNOS i d'iNOS al grup OVA+E2 respecte el grup OVA, no va modificar l'expressió de VCAM, el que indica que hi hauria altres mecanismes implicats en la regulació d'aquest element.

La rigidesa vascular és un dels principals símptomes de la disfunció vascular i la fibrosi és una de les seves causes [172]. La fibrosi es caracteritza per l'acumulació de proteïnes fibroses a la matriu extracel·lular que condueixen a la disfunció del teixit i el factor de creixement tissular TGF $\beta$ 1 és conegut per ser un dels principals reguladors i inductors de la fibrosi en diversos teixits [173]. Entre les principals causes de la fibrosi al teixit vascular trobem la dislipèmia, l'activació del sistema renina-angiotensina-aldosterona, l'estrès oxidatiu i, de forma destacada, la hiperglucèmia [174]. Es sabut que la hiperglucèmia incrementa els nivells de TGF $\beta$ 1 i es creu que la seva intervenció en la síntesi de proteoglicans accelera la captació de lipoproteïnes de baixa densitat i incrementa el desenvolupament de

la placa d'ateroma [175]. La major expressió de TGF $\beta$ 1 en els grups SHAM i OVA+E2 juntament amb una major d'expressió de COL1A i COL3A suggereix una major fibrosi aòrtica en aquests grups i també un major risc d'aterosclerosi.

Com ja s'ha anat comentat al llarg de la discussió, la hiperglucèmia, la resistència a la insulina, la hiperinsulinèmia i la hiperlipidèmia, presents en la DM2, són elements que promouen el desenvolupament de la disfunció endotelial a través de diversos mecanismes [176]. Tal i com s'observa a la figura 29, la insulina té múltiples efectes a nivell endotelial, que inclús poden ser contraris, i principalment estan mediat per dos eixos. Per una banda, per mitjà de la via de l'AKT, la insulina promou efectes anti-ateroscleròtics amb l'activació d'eNOS, l'increment de VEGFA i la reducció de VCAM. Per altra banda, a través de la via de l'ERK, es donen els efectes pro-ateroscleròtics, el que suposa una major expressió d'ET-1 i PAI-1. La prevalença d'una via o de l'altre depèn d'altres factors com la hiperglucèmia, la hiperlipèmia i les citocines proinflamatòries com TNF $\alpha$  i IL6, que es troben incrementats en la DM2 i inhibeixen les accions antiaterogèniques de la insulina a través de la via de l'AKT [177]. Així doncs, sembla que l'atenuació de la condició diabètica en les rates OVA podria explicar la menor expressió de marcadors de disfunció endotelial i risc d'aterotrombosi com PAI-1, VCAM i VEGFA en aquest grup en comparació als grups SHAM i OVA+E2.



**Figura 29: Efectes antagònics de la insulina sobre la funció vascular en funció de l'entorn.**

Font: Imatge adaptada de *Selective Insulin Resistance and the Development of Cardiovascular Diseases in Diabetes* (2016). [177]

En resum, a nivell aòrtic, la major expressió de VEGFA i eNOS juntament amb una menor expressió de VCAM, PAI-1, TGF $\beta$ 1, COL1A i COL3A en el grup OVA suggereixen que, globalment, l'ovariectomia en condicions de diabetisat suposaria una millor funció endotelial i un menor risc ateroescleròtic [169]. A més, l'E2 segurament és l'hormona principal involucrada en els efectes proateroescleròtics, en aquestes condicions, ja que el grup tractat amb aquesta hormona presenta un perfil similar al grup SHAM i més perjudicial que l'observat en les rates ovariectomitzades. D'acord amb les nostres observacions, la menor alteració de la glucèmia juntament amb un millor perfil circulat de factors de risc ateroescleròtic (HDL/LDL i leptina/adiponectina) trobada a les rates ovariectomitzades podrien contribuir a explicar el perfil menys perjudicial de disfunció endotelial a les aortes d'aquest grup respecte tan les rates diabètiques que mantenen les hormones sexuals com les ovariectomitzades tractades amb E2.

## **4.4 Efectes del 17 $\beta$ -estradiol a cèl·lules endotelials en condicions de glucolipotoxicitat**

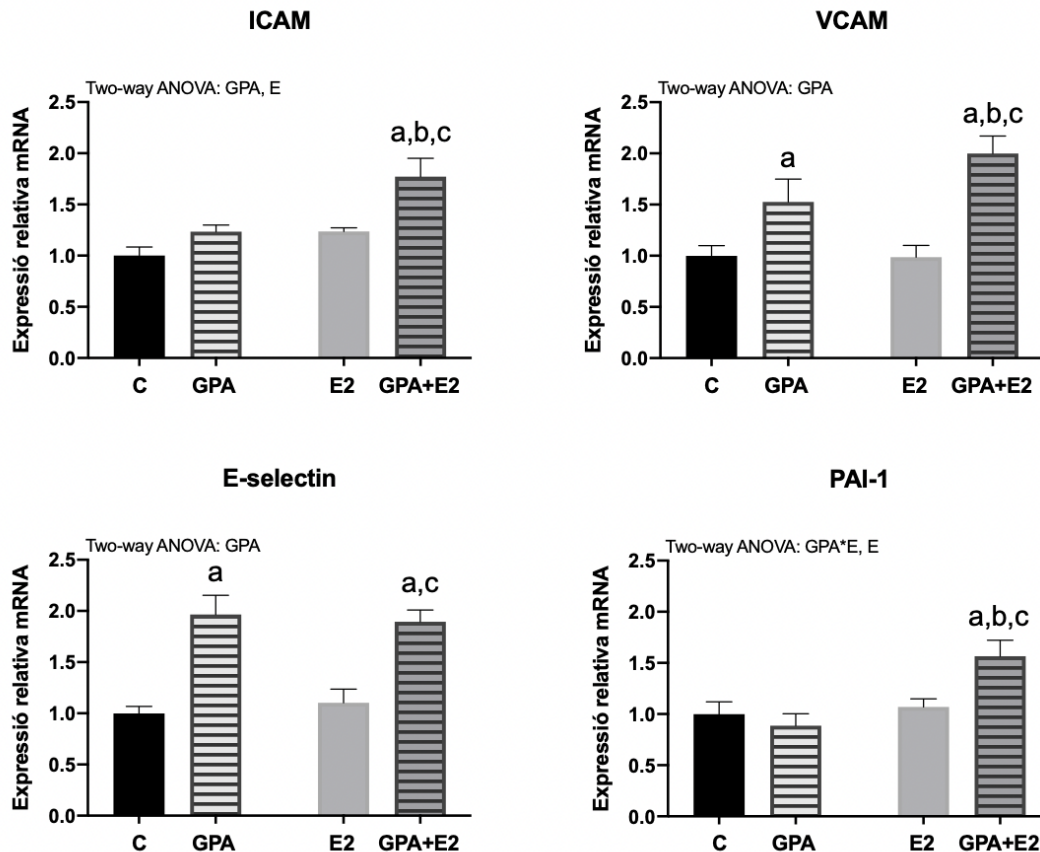
L'objectiu d'aquest apartat és estudiar els efectes del 17 $\beta$ -estradiol (E2) a cèl·lules endotelials en condicions de glucolipotoxicitat per tal d'aprofundir en els efectes observats *in vivo*, a nivell de l'endoteli vascular, en el model de rates ZDF ovariectomitzades i/o tractades amb E2. Aquest estudi *in vitro* es va realitzar amb cèl·lules endotelials humanes provinents de cordó umbilical (HUVEC) que varen ser sotmeses a unes condicions experimentals de glucolipotoxicitat amb glucosa i palmitat (GPA). L'ús de glucosa i palmitat, bé per separat o conjuntament, ha estat àmpliament utilitzat en HUVEC o altres cèl·lules endotelials, per a induir un fenotip de disfunció endotelial i inflamació, *in vitro*, amb característiques similars a les que s'observen en la obesitat i la DM2. Les condicions utilitzades, tan les concentracions de glucosa (30 mM) i palmitat (150  $\mu$ M) com el temps utilitzat (24h), han sigut les habitualment emprades a estudis similars [170], [178], [179] i varen ser validades al nostre laboratori prèviament.

### **4.4.1 Resultats**

#### **Efectes de l'E2 sobre l'expressió de marcadors de funció endotelial a HUVEC en condicions de glucolipotoxicitat**

La inducció de glucolipotoxicitat va produir un increment de l'expressió dels marcadors de disfunció endotelial ICAM, VCAM i E-selectina (figura 30). Curiosament, es va observar que l'E2 en condicions de glucolipotoxicitat, va induir una expressió encara més marcada d'ICAM i VCAM. Per altra banda, destaca que només es va veure un increment en l'expressió de PAI-1 quan les HUVEC varen ser tractades amb E2 en condicions de glucolipotoxicitat (GPA+E2).



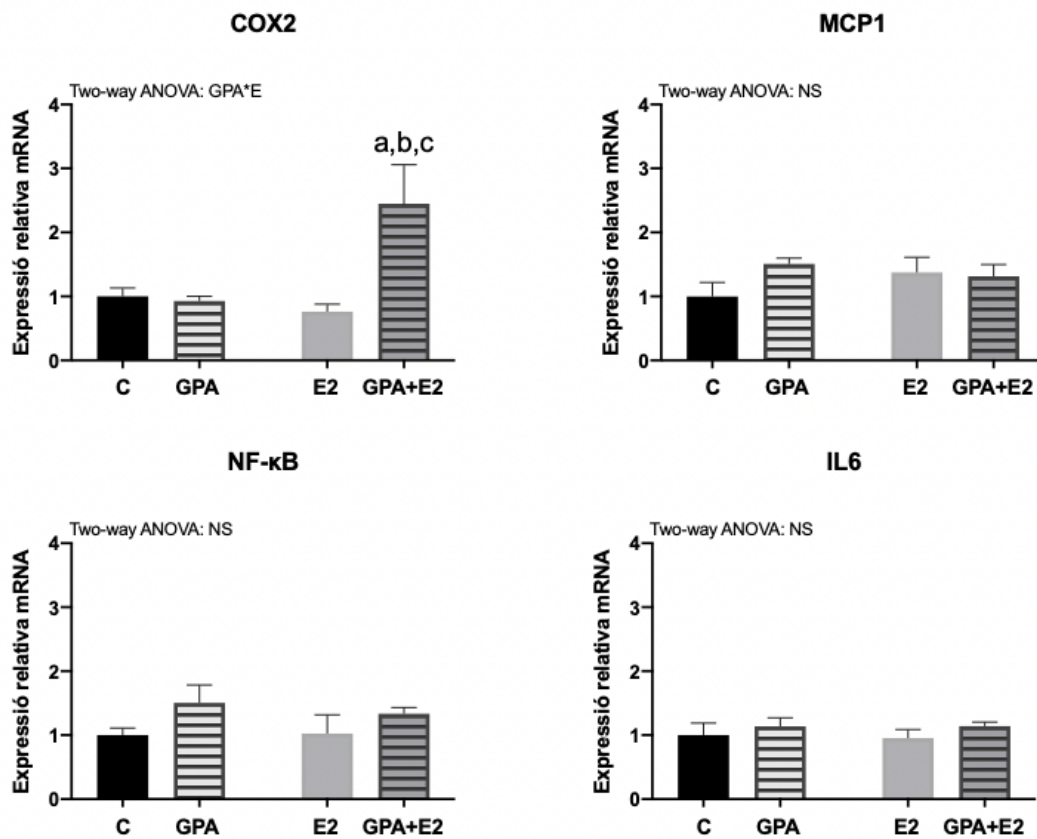


**Figura 30. Efecte de l'E2 sobre marcadors de disfunció endotelial a HUVEC en condicions de glucolipotoxicitat.**

Nivells d'expressió de mRNA normalitzats per GPADH. GPA: HUVEC tractades amb glucosa 30mM i palmitat 150 $\mu$ M. E2: HUVEC tractades amb 17 $\beta$ -estradiol 10nM durant 24h. GPA+E2: HUVEC tractades amb glucosa 30mM, palmitat 150 $\mu$ M i 17 $\beta$ -estradiol 10nM durant 24h. El control (C) va ser tractat amb la quantitat corresponent del vehicle de l'E2 (etanol) i del palmitat (BSA). Els valors s'expressen com a mitjana  $\pm$  error estàndard de dos experiments realitzats per triplicat (n=6). Two-way ANOVA ( $p < 0,05$ ): E (efecte estradiol), GPA (efecte glucolipotòxic), GPA\*E (efecte interactiu), NS (no significatiu). Test post-hoc LSD de Fisher ( $p < 0,05$ ): a, diferències vs. C; b, diferències vs. GPA; c, diferències vs E2.

### Efectes de l'E2 sobre l'expressió de marcadors d'inflamació a HUVEC en condicions de glucolipotoxicitat

En les condicions assajades de concentració i temps, es va observar un clar efecte interactiu entre GPA i E2 en l'expressió de COX2 (figura 31). La glucolipotoxicitat induïda per GPA va produir un increment de l'expressió de COX2 només al grup tractat amb E2. Pel que fa a la resta de marcadors estudiats (MCP1, NF- $\kappa$ B i IL6), ni GPA ni E2 varen modificar significativament la seva expressió.



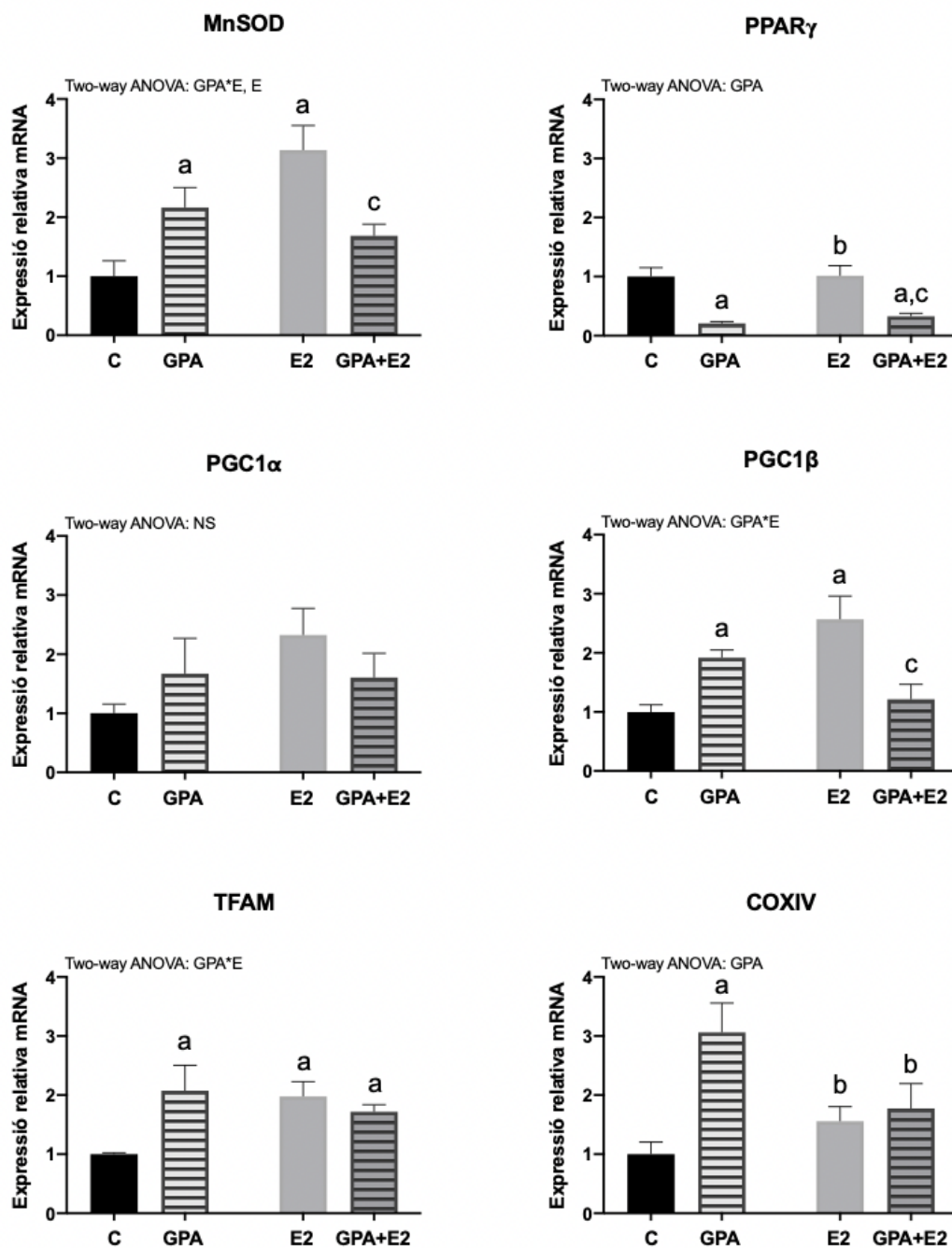
**Figura 31. Efecte de l'E2 sobre l'expressió de marcadors d'inflamació a HUVEC en condicions de glucolipotoxicitat.**

Nivells d'expressió de mRNA normalitzats per GPADH. GPA: HUVEC tractades amb glucosa 30mM i palmitat 150 $\mu$ M. E2: HUVEC tractades amb 17 $\beta$ -estradiol 10nM durant 24h. GPA+E2: HUVEC tractades amb glucosa 30mM, palmitat 150 $\mu$ M i 17 $\beta$ -estradiol 10nM durant 24h. El control (C) va ser tractat amb la quantitat corresponent del vehicle de l'E2 (etanol) i del palmitat (BSA). Els valors s'expressen com a mitjana  $\pm$  error estàndard de dos experiments realitzats per triplicat ( $n=6$ ). Two-way ANOVA ( $p<0,05$ ): GPA\*E (efecte interactiu), NS (no significatiu). Test post-hoc LSD de Fisher ( $p<0,05$ ): a, diferències vs. C; b, diferències vs. GPA; c, diferències vs E2.

### Efectes de l'E2 sobre l'expressió de marcadors de funció mitocondrial a HUVEC en condicions de glucolipotoxicitat

Els nostres resultats varen mostrar efectes contraris de l'E2 en funció de la glucolipotoxicitat del medi (efecte interactiu ANOVA  $p<0,05$ ) en l'expressió de TFAM, MnSOD i PGC1 $\beta$  (figura 32). La inducció de glucolipotoxicitat amb GPA i el tractament amb E2, per separat, varen incrementar l'expressió. No obstant el tractament conjunt amb GPA+E2 va atenuar aquest augment de MnSOD i PGC1 $\beta$ .

Aquest perfil també es va observar a PGC1 $\alpha$  malgrat no ser estadísticament significatiu ( $p=0,06$ ).



**Figura 32.** Efecte de l'E2 sobre l'expressió de marcadors de funció mitocondrial a HUVEC en condicions de glucolipotoxicitat.

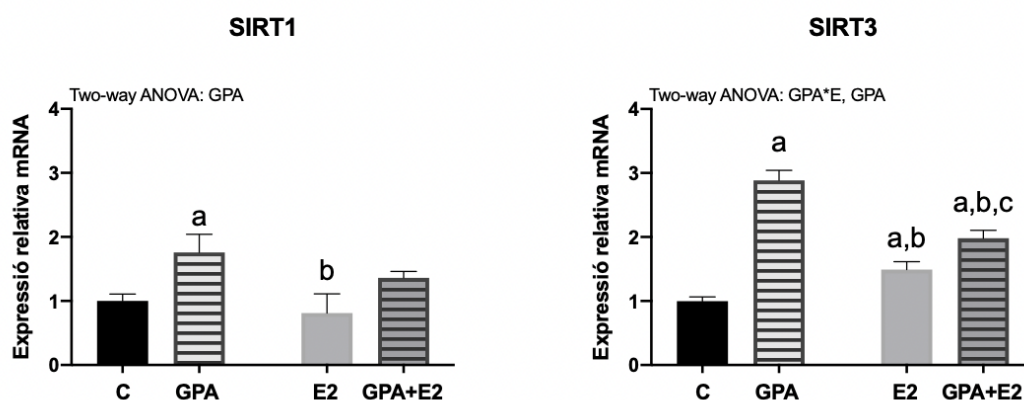
Nivells d'expressió de mRNA normalitzats per GPADH. GPA: HUVEC tractades amb glucosa 30mM i palmitat 150 $\mu$ M. E2: HUVEC tractades amb 17 $\beta$ -estradiol 10nM durant 24h. GPA+E2: HUVEC tractades amb glucosa 30mM, palmitat 150 $\mu$ M i 17 $\beta$ -estradiol 10nM durant 24h. El control (C) va ser tractat amb la quantitat corresponent del vehicle de l'E2 (etanol) i del palmitat (BSA). Els valors s'expressen com a mitjana  $\pm$  error estàndard de dos experiments realitzats per triplicat ( $n=6$ ). Two-way ANOVA ( $p<0,05$ ): E (efecte estradiol), GPA (efecte glucolipotòxic), GPA\*E

(efecte interactiu), NS (no significatiu). Test post-hoc LSD de Fisher ( $p < 0,05$ ): a, diferències vs. C; b, diferències vs. GPA; c, diferències vs E2.

Per altra banda, la glucolipotoxicitat va suposar efectes contraris a l'expressió de COXIV i PPAR $\gamma$ ; mentre que l'expressió de COXIV es va veure incrementada, la de PPAR $\gamma$  es va veure disminuïda i, curiosament, el tractament amb E2 en condicions de glucolipotoxicitat, va reduir l'increment observat en l'expressió de COXIV, però no va tenir cap efecte en el de PPAR $\gamma$ .

### Efectes de l'E2 sobre l'expressió de sirtuïnes a HUVEC en condicions de glucolipotoxicitat

En condicions de glucolipotoxicitat, les HUVEC varen mostrar un increment significatiu de l'expressió de les sirtuïnes 1 i 3 (figura 33). El tractament amb E2 no va produir canvis en l'expressió de SIRT1 però, en canvi, es va apreciar un efecte inductiu en l'expressió de SIRT3. Ara bé, el tractament amb E2 en condicions de glucolipotoxicitat va reduir significativament l'expressió de SIRT3.

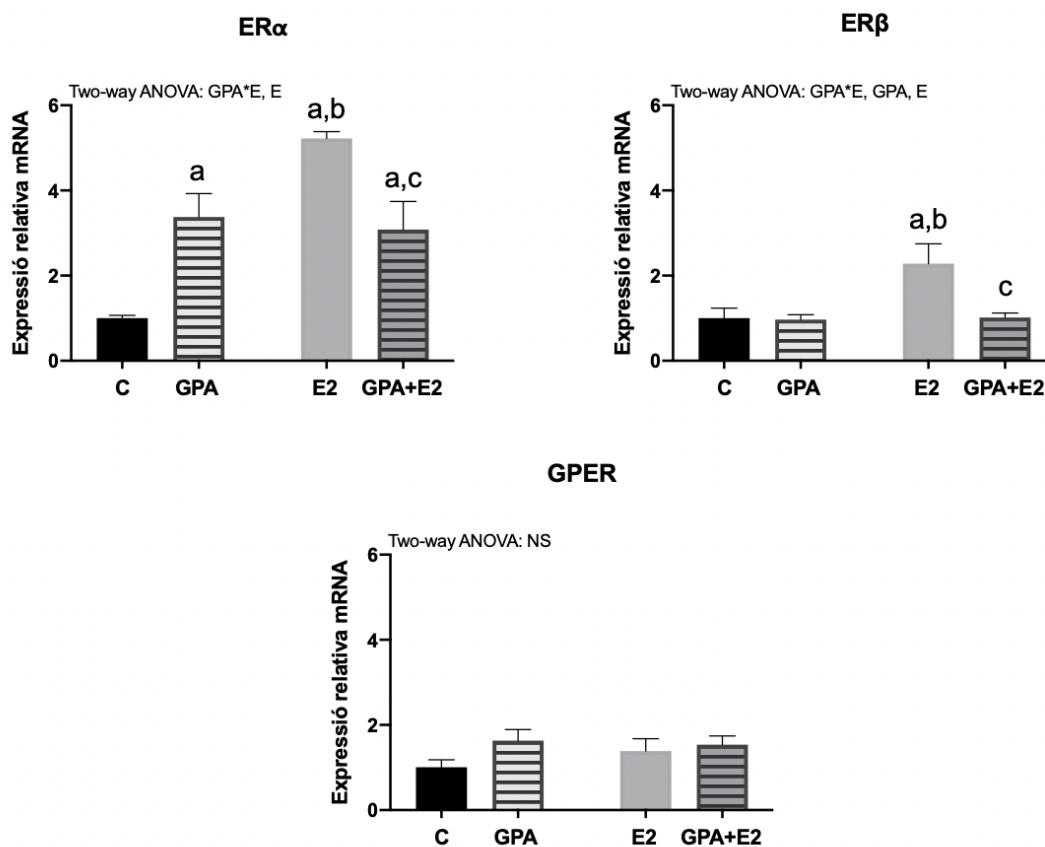


**Figura 33. Efecte de l'E2 sobre l'expressió de sirtuïnes a HUVEC en condicions de glucolipotoxicitat.**

Nivells d'expressió de mRNA normalitzats per GPADH. GPA: HUVEC tractades amb glucosa 30mM i palmitat 150 $\mu$ M. E2: HUVEC tractades amb 17 $\beta$ -estradiol 10nM durant 24h. GPA+E2: HUVEC tractades amb glucosa 30mM, palmitat 150 $\mu$ M i 17 $\beta$ -estradiol 10nM durant 24h. El control (C) va ser tractat amb la quantitat corresponent del vehicle de l'E2 (etanol) i del palmitat (BSA). Els valors s'expressen com a mitjana  $\pm$  error estàndard de dos experiments realitzats per triplicat ( $n=6$ ). Two-way ANOVA ( $p < 0,05$ ): GPA (efecte glucolipotòxic), GPA\*E (efecte interactiu). Test post-hoc LSD de Fisher ( $p < 0,05$ ): a, diferències vs. C; b, diferències vs. GPA; c, diferències vs E2.

### Efectes de l'E2 sobre l'expressió dels receptors d'estrogen a HUVEC en condicions de glucolipotoxicitat

El tractament amb E2 va augmentar l'expressió dels receptors nuclears d'estrògens ER $\alpha$  i ER $\beta$  (figura 34) i, sorprenentment, aquest augment de l'expressió, associat a l'E2, es va perdre en condicions de glucolipotoxicitat. Curiosament, en absència d'E2, les condicions de glucolipotoxicitat van produir un increment significatiu en l'expressió de ER $\alpha$ , però no de ER $\beta$ . Per altra banda, l'expressió de GPER no es va veure modificada de forma significativa per cap condició.



**Figura 34.** Efecte de l'E2 sobre l'expressió dels receptors d'estrogen a HUVEC en condicions de glucolipotoxicitat.

Nivells d'expressió de mRNA normalitzats per GAPDH. GPA: HUVEC tractades amb glucosa 30mM i palmitat 150 $\mu$ M. E2: HUVEC tractades amb 17 $\beta$ -estradiol 10nM durant 24h. GPA+E2: HUVEC tractades amb glucosa 30mM, palmitat 150 $\mu$ M i 17 $\beta$ -estradiol 10nM durant 24h. El

control (C) va ser tractat amb la quantitat corresponent del vehicle de l'E2 (etanol) i del palmitat (BSA). Els valors s'expressen com a mitjana  $\pm$  error estàndard de dos experiments realitzats per triplicat ( $n=6$ ). Two-way ANOVA ( $p<0,05$ ): E (efecte estradiol), GPA (efecte glucolipotòxic), GPA\*E (efecte interactiu), NS (no significatiu). Test post-hoc LSD de Fisher ( $p<0,05$ ): a, diferències vs. C; b, diferències vs. GPA; c, diferències vs E2.

#### 4.4.2 Discussió

La relació entre la diabetis, la obesitat i la malaltia cardiovascular, tot i tenir una naturalesa complexa, està ben establerta i la inflamació és un intermediari necessari que ha estat molt ben definit. Molt breument, l'acumulació de lípids i glucosa, la seva oxidació i la resistència a la insulina, a banda dels efectes directes, produeixen una resposta inflamatòria a diferents nivells que altera l'homeòstasi i la senyalització cel·lular el que, amb el temps, comporta la disfunció dels diferents teixits i òrgans [180], [181]. L'efecte antiinflamatori de l'E2 ha sigut àmpliament estudiat, hi ha evidències de que l'E2 podria tenir cert paper protector front  $H_2O_2$  [182], TNF- $\alpha$  [149] i Proteïna C Reactiva [183] reduint el grau d'apoptosi o l'expressió de mediadors proinflamatoris. Tot i així, si bé es cert que hi ha pocs estudis sobre l'efecte deleteri de l'estradiol en certes condicions, com l'envelliment o la diabetis, alguns treballs realitzats amb models *in vivo*, han posat de manifest que l'E2 podria tenir un efecte proinflamatori alterant la permeabilitat vascular, la síntesi de productes d'AGEs i incrementant l'estrès oxidatiu [184]. Els nostres resultats *in vivo* a aortes del model de rates ZDF (capítol 4.3) posen de manifest aquest efecte negatiu de les hormones sexuals femenines, i en concret de l'E2, sobre la funció endotelial i el risc arterioscleròtic que suposa la diabetis.

En el nostre estudi *in vitro*, les condicions de glucolipototoxicitat induïdes amb GPA van tenir escassa repercussió en la inflamació a jutjar pels principals marcadors estudiats (IL6, MCP1, COX2 i NF- $\kappa$ B). No obstant, cal indicar que, en el cas de COX2, es posa de manifest que l'E2 indueix l'expressió d'aquest marcador d'inflamació en condicions de glucolipototoxicitat. COX2 és un enzim pro-

inflamatori involucrat, entre altres coses, en la síntesi de molècules amb capacitat inflamatòria com les prostaglandines, així com també, molècules involucrades en l'hemostàsia, com el tromboxà A2 [185]. En diferents models animals s'ha posat de manifest que tan les prostaglandines com el tromboxà A2 tenen activitat sobre la contractilitat vascular i, a més, aquestes molècules són característiques de vasos sanguinis envellits i disfuncionals [185]. Així mateix, la COX2 també s'ha relacionat amb la trombosi, la inestabilitat de la placa d'ateroma i, juntament amb altres elements, s'ha descrit que COX2 està implicada en les complicacions microvasculars, com la retinopatia diabètica, associades a la hiperglucèmia crònica, a través de l'activació de l'apoptosi. De fet, cal destacar que la inhibició farmacològica de la COX2 té un paper protector enfront els efectes deleteris de la glucosa [186]. Aleshores, els nostres resultats indiquen que, malgrat el model amb GPA utilitzat sembla que no va induir una resposta inflamatòria detectable, el tractament combinat amb E2 suposaria una potenciació de l'efecte inflamatori, pel que fa a aquest paràmetre.

Un dels efectes que produeix l'estat inflamatori a nivell vascular és l'alteració de la permeabilitat vascular a leucòcits. Les cèl·lules endotelials, en determinades condicions com la hiperglucèmia i la inflamació, expressen en la seva superfície molècules d'adhesió, com la ICAM, la VCAM o la E-selectina. Aquestes proteïnes permeten que cèl·lules inflamatòries com monòcits i limfòcits s'adhereixin i puguin travessar l'endoteli i segregar citocines proinflamatòries i enzims involucrats en la formació i progressió de la placa d'ateroma [156], [187]. A més, condicions com la hiperglucèmia, la hiperinsulinèmia i la inflamació també alteren, a nivell endotelial, la regulació de molècules relacionades amb l'hemostàsia com el PAI-1, que s'ha vist que té un important paper en el desenvolupament de la placa d'ateroma i formació de trombes [48], [121].

En tots els marcadors de disfunció endotelial que hem estudiat (ICAM, VCAM i PAI-1), s'observa que el tractament amb E2 potencia l'efecte deleteri produït per l'entorn glucolipotòxic induït per GPA, exceptuant en E-selectina pel qual no

s'observa cap efecte. Aquests resultats són molt interessants ja que estarien en línia amb els resultats observats als nostres estudis amb aortes de rates obesas i diabètiques ZDF (capítol 4.3), en les que s'observa un increment en paràmetres de disfunció endotelial a l'aorta en presència d'hormones sexuals femenines o amb el tractament amb E2, però una reducció dels mateixos marcadors a les rates ovariectomitzades.

És sabut que la inflamació i la disfunció mitocondrial són dos processos estretament lligats, tot i que no està molt clar quin dels dos processos és la causa i quin la conseqüència [188]. En els últims anys, ha cobrat importància la possible relació de la disfunció mitocondrial en el desenvolupament de la malaltia arterioscleròtica [189]. TFAM i COXIV es consideren marcadors de la funció mitocondrial perquè estan relacionats amb la biogènesi mitocondrial i el grau d'expressió es relaciona amb el contingut mitocondrial i amb l'eficiència d'aquest orgànul [190]. L'estudi de la funció mitocondrial en el nostre model, suggereix que el tractament amb GPA no va produir disfunció mitocondrial en les HUVEC, sinó més bé el contrari, ja que l'expressió dels marcadors TFAM, COXIV i MnSOD es trobava induïda. *A priori*, tan la glucosa com el palmitat, són substrats energètics del mitocondri i l'elevada disponibilitat en les condicions de glucolipotoxicitat assajades, suggereix un increment en la seva metabolització, la qual estaria associada a un augment en l'expressió de gens mitocondrials. S'ha descrit que la disfunció mitocondrial es manifesta quan aquesta aportació energètica és sostinguda o sobrepassa les capacitats oxidatives de la cèl·lula i l'excés de ROS produït acaba alterant les vies de senyalització [104], [188]–[192]. PPAR $\gamma$ , és un receptor nuclear que activa l'expressió de diferents gens per interacció directa amb el DNA i és un dels principals elements reguladors del metabolisme de la glucosa i la  $\beta$ -oxidació de lípids [193]. Addicionalment, també s'han descobert altres funcions de PPAR $\gamma$  en el sistema cardiovascular, concretament en el teixit muscular cardíac i en l'endoteli vascular [194], [195]. La



reducció de l'expressió de PPAR $\gamma$ , induïda pel tractament amb GPA, que observam a les HUVEC aniria en línia a altres estudis sobre la participació de PPAR $\gamma$  en la regulació de l'angiogènesi vascular on s'ha vist que la reducció de l'expressió de PPAR $\gamma$  a l'endoteli vascular de la retina de rates diabètiques, podria ser la causa del desenvolupament de la retinopatia diabètica [193]. A més, un estudi recent a HUVEC sotmeses a un tractament amb glucosa (a concentracions similars a les nostres) ha descrit també la disminució de l'expressió de PPAR $\gamma$  la qual, els autors associen a un major grau d'apoptosi [196]. Diferents estudis han reportat que les hormones sexuals com l'E2 activen l'expressió de PPAR $\gamma$  en teixits sensibles a la insulina com el fetge, el múscul o el teixit adipós. Per aquest motiu, va ser sorprenent que el tractament amb E2 (tan en condicions control com glucolipotòxiques) no mostràs efectes en l'expressió de PPAR $\gamma$ . No obstant, els efectes atribuïts a les hormones sexuals sembla que depenen de les condicions del tractament (concentració i duració), el teixit o inclús el grau de diferenciació cel·lular i per tant els resultats obtinguts són difícilment comparables i generen controvèrsies. La gran variabilitat de resultats esmenada i el fet de que l'endoteli no es consideri un teixit amb funcions metabòliques (a diferència dels teixits més estudiats i dels que es té més informació en relació a PPAR $\gamma$ ) permet valorar la manca d'efectes de l'E2 en les HUVEC com una possibilitat acceptable.

Per altra banda, en el nostre grup d'investigació tenim evidències sobre l'efecte de l'E2 estimulants la biogènesi i la funció mitocondrial en diversos tipus de cultius cel·lulars i teixits [63], [125]. Els nostres resultats a HUVEC confirmen que el tractament amb E2 també estimula l'expressió de marcadors involucrats en la biogènesi mitocondrial com TFAM i PGC1 $\beta$ , així com, gens involucrats en la defensa antioxidant com MnSOD. Curiosament, s'ha de destacar que en condicions de glucolipototoxicitat, el tractament amb E2 disminueix l'expressió dels marcadors de biogènesi mitocondrial (PGC1 $\beta$ , PPAR $\gamma$ ) i de defensa antioxidant

(MnSOD). En conjunt, els nostres resultats a HUVEC indiquen que els efectes de l'E2 sobre la capacitat de resposta oxidativa i antioxidant són depenents de la disponibilitat de substrats energètics. Concretament, tot sembla indicar que l'E2, en condicions de glucolipotoxicitat, conduiria a un empitjorament de la funció mitocondrial mentre que, en condicions control la milloraria.

Les sirtuïnes són un grup de desacetilases que, recentment, s'ha vist que estan involucrades en diferents malalties com la diabetis o les MCV [197]. Les funcions de SIRT1 i SIRT3 (així com de la resta de sirtuïnes) varien depenent del teixit i de les condicions d'estudi, per tal motiu, a dia d'avui és difícil establir quines són les seves funcions i com es regula la seva expressió. Tot i això, hi ha evidències sobre l'efecte que té l'estrès metabòlic i l'estrès oxidatiu reduint la seva expressió i els efectes beneficiosos de la seva sobreexpressió per fer front a l'apoptosi i incrementar la supervivència en diferents tipus cel·lulars [198]. S'ha vist que les sirtuïnes 1 i 3 tenen un paper important en la homeòstasi vascular i, concretament, la SIRT1 (la més estudiada) s'ha postulat com una important diana terapèutica per al tractament de malalties cardiovasculars en pacients diabètics. Els nostres resultats mostren un increment de l'expressió de SIRT1 i SIRT3 en condicions de glucolipotoxitat, la qual cosa podria ser un efecte adaptatiu, tal i com s'ha descrit a rates durant l'inici d'una administració de dieta rica en greix [199] (efecte que disminueix amb el temps). Seguint amb aquesta idea, és important indicar que l'elevació de l'expressió de SIRT1 i SIRT3 que observem en condicions glucolipotòxiques, recolzaria l'increment de marcadors mitocondrials observada i comentada anteriorment, ja que les sirtuïnes (SIRT1 especialment), estan implicades en l'activació de la transcripció de gens mitocondrials [198]. Si acceptem la hipòtesi de que la major expressió de SIRT3 induïda per GPA seria una adaptació a l'excés de substrats energètics que decauria amb el temps [199], en el nostre cas, el tractament amb E2 en condicions de glucolipotoxicitat, sembla que tindria un efecte contraproductiu perquè atenua l'increment de SIRT3 en

aquest grup, el que podria indicar un bloqueig d'aquest mecanisme adaptatiu. A més, s'ha descrit que les sirtuïnes tenen capacitat d'inhibir l'expressió de VCAM i ICAM a cèl·lules endotelials [198] i, de fet, la menor expressió de SIRT3 en el grup tractat amb E2 en condicions glucolipotòxiques s'acompanya d'una major expressió de marcadors de disfunció endotelial.

El tractament amb E2 produeix una major inducció en l'expressió d'ER $\alpha$  que d'ER $\beta$  (al voltant de tres vegades més) el que podria indicar que els efectes d'E2 observats podrien ser mediats prioritàriament, a través d'aquest receptor, però caldrien més estudis per confirmar-ho. Per altra banda, el tractament amb E2 en un entorn glucolipotòxic mostra un clar efecte interactiu en l'expressió dels receptors d'estrògens nuclears ER $\alpha$  i ER $\beta$ , ja que, desapareix l'efecte inductor de l'E2 observat en la situació control. Aquest fet podria estar relacionat amb la reducció de l'expressió de SIRT3 i en l'expressió d'altres gens regulats per SIRT3. La menor expressió de SIRT3 en condicions de glucolipototoxicitat podria associar-se a l'increment de COX2 i marcadors de disfunció endotelial com VCAM i ICAM [198]. Curiosament, ER $\alpha$  i ER $\beta$  tenen una resposta diferent enfront a GPA. Tal i com indiquen els nostres resultats, l'expressió d'ER $\alpha$  curiosament augmenta mentre que la d'ER $\beta$  es manté inalterada, la qual cosa podria indicar que un ambient glucolipotòxic podria influir en la senyalització estrogènica a través de modificacions en la dotació dels receptors estrogènics nuclears.

En resum, els nostres resultats indiquen que el tractament amb E2 de les HUVEC en condicions de glucolipototoxicitat té un efecte inductor de la inflamació i de la disfunció endotelial i mitocondrial. Aquests resultats estan d'acord amb els obtinguts a les aortes de les rates ZDF on veiem que les hormones sexuals femenines, i en concret l'E2, en condicions de diabetat promouen una major expressió de marcadors de disfunció endotelial en comparació a les rates ovariectomitzades.



## **5. Recapitulació**

S'ha descrit que la condició femenina protegeix front al desenvolupament de certes malalties com la diabetis i la obesitat i aquest fet s'associa a l'acció de les hormones sexuals femenines. De fet, durant la menopausa, la reducció dels nivells circulants d'hormones ovàriques incrementa la incidència de trastorns metabòlics associats a l'estat l'obès com la diabetis o la malaltia cardiovascular [200]. Estudis previs en el nostre grup d'investigació han posat de manifest que la depleció hormonal, mitjançant ovariectomia, produeix disfunció mitocondrial, augment del pes corporal i de l'adipositat, així com de la glucèmia i resistència a la insulina en rates joves i sanes [63]–[66]. No obstant, recentment diverses publicacions han suggerit que factors com la *diabetis mellitus*, incrementen el risc de morir per malalties cardiovasculars en dones premenopàusiques en comparació amb homes de la mateixa edat [5]–[8], la qual cosa ha generat un interessant debat a la comunitat científica sobre un possible efecte dual dels estrògens sobre la patogènia de la diabetis i el desenvolupament de malalties cardiovasculars en funció de l'entorn metabòlic.

El nostre estudi sobre els efectes de les hormones sexuals femenines en rates obesas i diabètiques ZDF ha confirmat que l'ovariectomia atenua les manifestacions fisiopatològiques de la diabetis i indueix una millora de l'estat diabètic. Encara que la disminució de la glucèmia no es va veure acompanyada per una reducció del pes corporal, sinó el contrari, és important remarcar que aquest increment no es va traduir en un augment de teixit adipós visceral, la qual cosa suggereix un increment d'altres dipòsits adiposos menys perjudicials i no tan vinculats amb el risc cardiovascular. L'augment de l'adiponectina circulant observat en el grup de rates ovariectomitzades suggereix una expansió més saludable del teixit adipós en aquest grup, ja que s'ha vist que l'adiponectina contribueix a la salut cardiovascular i millora la sensibilitat a la insulina. També és important remarcar que el perfil lipídic circulant va ser similar entre les rates diabètiques no manipulades hormonalment i les ovariectomitzades, el que

confirma que l'increment del pes corporal no es va traduir en un perfil circulant més lesiu. Per altra banda, el tractament amb E2, tot i haver produït una reducció en el pes corporal i en l'adipositat visceral d'aquests animals, es va acompanyar d'un increment de la glucèmia i dels nivells de triglicèrids, NEFAs i colesterol-LDL, així com d'una reducció del colesterol-HDL i dels nivells d'adiponectina, establint-se un perfil circulant més aterogènic. Així doncs, els nostres resultats semblen indicar que les hormones sexuals femenines, en condicions de diabetat, podrien interferir negativament en la capacitat per emmagatzemar els lípids de forma saludable en el teixit adipós i que l'E2, en concret, podria contribuir a un perfil lipèmic menys cardiosaludable.

La diabetat promou nombroses alteracions a nivell metabòlic que comprometen la funcionalitat de diferents òrgans d'entre els que destaquem el cor. En aquest aspecte, la disminució de la glucèmia i de la resistència a la insulina en el grup de rates diabètiques sotmeses a privació hormonal està d'acord amb una major activació de la via de senyalització de la insulina al múscul cardíac. A més, els canvis en l'expressió dels transportadors de glucosa i d'àcids grassos suggereixen una millor homeòstasi energètica al cor que es relacionaria amb un balanç entre la utilització de la glucosa i els àcids grassos com a substrats energètics més fisiològic. Per altra banda, la desregulació de la via de senyalització de la insulina i la hiperglucèmia s'han relacionat amb un increment de la fibrosi al cor [20], [75], [119], el que explicaria de forma raonable que l'atenuació de la hiperglucèmia en les rates ovariectomitzades es relacionés amb una menor expressió de marcadors de fibrosi com TGF $\beta$ 1 o PAI-1. A més a més, el tractament amb E2 de les rates ovariectomitzades, va revertir l'atenuació de la glucèmia i l'activació de la via de la insulina al cor de les rates ovariectomitzades, el que estaria d'acord amb l'increment dels marcadors de fibrosi al cor observats en aquest grup. Continuant amb l'homeòstasi energètica del cor, els nostres resultats indiquen que, tot i no apreciar diferències significatives a nivell

d'expressió i contingut de proteïnes mitocondrials, sí es va observar un increment en el consum d'oxigen en els mitocondris cardíacs associat a l'ovariectomia, amb una taxa de respiració semblant a la de les rates sanes, i que suggereix una major capacitat oxidativa mitocondrial. A més, aquest increment del consum d'oxigen no va suposar un increment del dany oxidatiu de proteïnes i lípids al cor de les rates ovariectomitzades. El fet de que els beneficis de l'ovariectomia sobre l'homeòstasi energètica i la fibrosi cardíaca siguin revertits pel tractament amb E2, recolza la idea d'un efecte negatiu dels estrògens en una situació de diabetat.

El cor és un òrgan molt dependent del subministrament d'oxigen, atesa la seva elevada demanda energètica. La capacitat per mantenir el to vascular en les arterioles que vascularitzen tot el teixit és important per garantir el subministrament d'oxigen i evitar la hipòxia cel·lular. En aquest sentit, l'increment en l'expressió d'HIF-1 $\alpha$  en les rates ovariectomitzades no només estaria relacionat amb la cardioprotecció front la hipòxia, sinó que també, segons alguns autors [117], suggereix una millor utilització dels substrats energètics. També és important afegir que l'ovariectomia va suposar una reducció important en l'expressió de PAI-1, relacionat amb l'aterogènicitat de l'endoteli vascular i la isquèmia cardíaca [201], i que va ser revertida pel tractament amb E2. Atès el conegut paper del receptor de membrana GPER en la mediació dels efectes cardioprotectors de l'E2, la menor expressió d'aquest receptor a les rates diabètiques no ovariectomitzades suposa un argument addicional a favor de que l'entorn metabòlic podria alterar l'efecte cardioprotector dels estrògens.

A nivell vascular, es sabut que la hiperglucèmia i la dislipèmia són les principals causes de la disfunció endotelial en la diabetat i són dos factors de risc fonamentals en el desenvolupament de l'aterosclerosi. En aquest sentit, la millora de l'homeòstasi glucídica produïda per l'ovariectomia, juntament amb l'increment de la glucèmia i la dislipèmia a conseqüència del tractament amb E2,



posen de manifest l'efecte potenciador de l'E2 en el risc aterogènic en la situació de diabetat. La disfunció endotelial es manifesta principalment amb la incapacitat de mantenir el to vascular, amb la rigidesa vascular deguda a la fibrosi de la matriu extracel·lular i per l'increment de la permeabilitat i adhesió cel·lular. En aquest sentit, els nostres resultats indiquen que, en la diabetat, la depleció hormonal atenua l'expressió, a l'aorta, dels principals promotors de la fibrosi com TGF $\beta$ 1 i PAI-1, possiblement degut a la menor glucèmia d'aquest grup. Pel que fa a l'increment de la permeabilitat, la menor expressió de VCAM, una molècula que facilita l'adhesió cel·lular a l'endoteli i es relaciona amb la formació de la placa d'ateroma, i de PAI-1, també involucrat amb l'aterogènesi, en les rates ovariectomitzades, suposarien un menor risc de formació de plaques d'ateroma a l'aorta. Aquesta menor expressió podria ser deguda a l'efecte supressor de l'òxid nítric, que estaria incrementat com a conseqüència de la major expressió d'eNOS observada en aquest grup. En aquest sentit, la menor glucèmia i la major sensibilitat sistèmica a la insulina d'aquest grup podria ser la causa de l'esmentada major expressió d'eNOS, així com d'iNOS, el que suposaria una millor capacitat per mantenir el to vascular [76]. La major expressió de PGC1 $\alpha$  observada a les rates ovariectomitzades estaria d'acord amb aquesta idea, ja que s'ha vist que el coactivador PGC1 $\alpha$  regula positivament l'expressió d'eNOS [159]. Tot plegat, el nostre estudi de l'expressió gènica de les aortes ha permès observar que les hormones sexuals femenines, i en concret l'E2, incrementen notablement els marcadors d'inflamació i de disfunció endotelial en condicions de diabetat, la qual cosa està d'acord amb la hiperglucèmia i dislipèmia que presenta aquest grup. Per altra banda, els efectes del tractament amb E2 a les aortes de les rates ovariectomitzades són consistents amb els resultats obtinguts *in vitro*. La incubació de cèl·lules endotelials HUVEC en condicions de glucolipototoxicitat mostra que l'E2 incrementa l'expressió de marcadors de disfunció endotelial. A més, aquest efecte potenciador de l'E2 també es va observar en marcadors de fibrosi i adhesió com PAI-1 i d'inflamació com COX-2. Els resultats obtinguts a

nivell de marcadors de biogènesi mitocondrial i de defensa antioxidant van en la mateixa línia i confirmen aquests efectes negatius de l'E2, que estan d'acord amb els efectes observats a les aortes de les rates ZDF. La major expressió de VCAM i ICAM a les HUVEC tractades amb E2, en condicions de glucolipototoxicitat, podria atribuir-se a la menor expressió de la sirtuïna SIRT3 que presenten, ja que s'ha descrit que aquesta desacetilasa té la capacitat d'inhibir l'expressió d'aquests gens a cèl·lules endotelials [198].

Si bé es cert que hi ha evidències de que la pèrdua d'hormones sexuals femenines suposen una acceleració del desenvolupament de diabetat en rates sanes i que el tractament amb E2 té un paper protector, gairebé no hi ha estudis sobre els efectes de la depleció hormonal en rates que ja presenten diabetat prèvia a la ovariectomia. A més, sobre els estudis relatius als efectes de la depleció hormonal en rates sanes, és importat remarcar que alguns autors manifesten que els efectes de l'ovariectomia depenen de l'edat a que aquesta es realitza [129]. Aquest fet posa de manifest la importància de les condicions metabòliques a les quals es du a terme la manipulació hormonal. Per altra banda, en humans, la investigació sobre els efectes cardiovasculars de les hormones sexuals femenines no és molt extensa ja que, segons la perspectiva clàssica, les dones es consideren protegides a nivell cardiovascular i es troben infrarepresentades en la majoria d'estudis observacionals i els assajos clínics. No obstant, amb l'inici de la teràpia hormonal substitutiva en dones peri o postmenopàusiques es va produir un increment en la investigació sobre els efectes cardiovasculars de les hormones sexuals femenines. Això va ser degut a que, contra tot pronòstic, la teràpia hormonal substitutiva va suposar un increment global en el risc cardiovascular. No obstant, metaanàlisis posteriors en el marc dels estudis WHI i ELITE, varen donar lloc al que avui es coneix com la *Timing Hypothesis*, que intenta explicar el motiu pel qual la teràpia hormonal substitutiva només incrementa el risc cardiovascular en aquelles dones que comencen la teràpia hormonal després de

5-10 anys dels primers símptomes climateris [69]. Aquest fet sembla indicar, que després de la menopausa es donarien una sèrie de canvis metabòlics (increment de diabetis, dislipèmia...) que faria canviar la resposta del cos davant un mateix tractament, manifestant aquesta dualitat dels estrògens. En aquest aspecte, el nostre estudi incrementa el coneixement entorn l'efecte dual, positiu o negatiu, de les hormones sexuals femenines a nivell cardiovascular en condicions de diabetat, que aniria més enllà de la concepció clàssica només referent als efectes positius dels estrògens descrits en condicions no diabètiques. El present treball relaciona, en cor i aorta, la contribució de les hormones sexuals femenines, i en concret la de l'E2, amb l'empitjorament de la condició patològica diabètica prèvia. A més, també es posa de manifest la important relació de la condició diabètica en les alteracions a nivell de l'homeòstasi energètica i la fibrosi cardíaca al cor, així com en la disfunció endotelial a l'aorta. De la mateixa manera, també cal posar de relleu la importància dels efectes observats *in vitro*, en cèl·lules endotelials, que reforcen, encara més, els resultats observats en les rates ZDF sobre l'efecte potenciador de l'E2 sobre la disfunció endotelial en condicions de diabetat.

En resum, aquesta tesi posa de manifest que l'entorn metabòlic influeix en les accions de les hormones sexuals femenines, i que, en condicions de diabetat, produeixen un increment de marcadors relacionats amb un major risc cardiovascular com la hiperglucèmia, la resistència a la insulina, la fibrosi cardíaca i la disfunció endotelial principalment. També hem evidenciat que el tractament amb E2 reverteix l'atenuació, produïda per l'ovariectomia, de la condició patològica de les rates diabètiques. Aquestes noves evidències suposen el contrapunt a les atribucions clàssiques de les hormones ovàriques en la cardioprotecció i posen de manifest el paper dual, positiu o negatiu, que tindrien les hormones sexuals femenines en funció de l'entorn metabòlic.



## **6. Conclusions**

- I. La privació de les hormones ovàriques atenua la condició patològica associada a la diabetat que presenten les rates femella ZDF, el que es posa de manifest en una menor glucèmia i una millora dels paràmetres relacionats amb l'homeòstasi glucídica, com la hemoglobina glicosilada, els tests de tolerància a la glucosa i a la insulina i l'adiponectinèmia.
- II. En rates diabètiques ZDF, l'ovariectomia promou un perfil d'expressió gènica relacionat amb una millor homeòstasi energètica al cor, una menor disfunció endotelial a l'aorta, així com una menor fibrosi a ambdós teixits, el que és indicatiu d'un sistema cardiovascular menys alterat.
- III. A rates ZDF, el tractament amb estradiol reverteix els efectes atenuadors de la ovariectomia sobre la condició patològica associada a la diabetat, la qual cosa reforça la idea d'un efecte deleteri dels estrògens en un entorn diabètic.
- IV. En condicions de glucolipototoxicitat, l'estradiol té un efecte inductor de la inflamació i de la disfunció endotelial i mitocondrial en cèl·lules HUVEC, que confirma els efectes observats *in vivo* a les aortes de les rates ZDF diabètiques.
- V. Els estrògens presenten un efecte dual, positiu o negatiu, en funció de l'entorn metabòlic, de tal manera que, en una situació de diabetat, la depleció d'hormones ovàriques resulta beneficiosa, al contrari del que s'ha descrit en situació control.



## **7. Referències bibliogràfiques**



- [1] World Health Organisation, “The top 10 causes of death,” *Global Health Estimates* 2016, 2018. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/> (accessed May 24, 2018).
- [2] INE, “Defunciones según las causas de muerte por grupos de enfermedades,” 2018. [Online]. Available: [https://www.ine.es/prensa/edcm\\_2017.pdf](https://www.ine.es/prensa/edcm_2017.pdf).
- [3] T. R. Einarson, A. Acs, C. Ludwig, and U. H. Panton, “Prevalence of cardiovascular disease in type 2 diabetes: A systematic literature review of scientific evidence from across the world in 2007-2017,” *Cardiovasc. Diabetol.*, vol. 17, no. 1, pp. 1–19, 2018, doi: 10.1186/s12933-018-0728-6.
- [4] International Diabetes Federation (IDF), “IDF DIABETES ATLAS,” 2017. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31679-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31679-8).
- [5] R. R. Huxley, S. A. E. Peters, G. D. Mishra, and M. Woodward, “Risk of all-cause mortality and vascular events in women versus men with type 1 diabetes: A systematic review and meta-analysis,” *Lancet Diabetes Endocrinol.*, vol. 3, no. 3, pp. 198–206, 2015, doi: 10.1016/S2213-8587(14)70248-7.
- [6] S. Tonstad, “Identifying obese women most at risk from cardiovascular disease,” *Int. J. Obes.*, vol. 31, pp. S19–S25, 2007, doi: 10.1038/sj.ijo.0803732.
- [7] A. Norhammar, “Diabetes and cardiovascular mortality: the impact of sex,” *Lancet Diabetes Endocrinol.*, vol. 6, no. 7, pp. 517–519, 2018, doi: 10.1016/S2213-8587(18)30111-6.
- [8] E. R. C. Millett, S. A. E. Peters, and M. Woodward, “Sex differences in risk factors for myocardial infarction: Cohort study of UK Biobank participants,” *BMJ*, vol. 363, 2018, doi: 10.1136/bmj.k4247.
- [9] T. Ketepe-arachi and S. Sharma, “Cardiovascular Disease in Women: Understanding Symptoms and Risk Factors,” *Eur. Cardiol. Rev.*, vol. 12(1),

- pp. 10–13, 2017, doi: 10.15420/ecr.2016:32:1.
- [10] L. S. Mehta *et al.*, *Acute Myocardial Infarction in Women: A Scientific Statement from the American Heart Association*, vol. 133, no. 9. 2016.
- [11] G. A. Mensah *et al.*, “Decline in Cardiovascular Mortality: Possible Causes and Implications,” *Circ. Res.*, vol. 120, no. 2, pp. 366–380, 2017, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.309115.
- [12] S. S. Virani *et al.*, “Gender disparities in evidence-based statin therapy in patients with cardiovascular disease,” *Am. J. Cardiol.*, vol. 115, no. 1, pp. 21–26, 2015, doi: 10.1016/j.amjcard.2014.09.041.
- [13] M. W. Schoen, R. G. Tabak, J. Salas, J. F. Scherrer, and F. R. Buckhold, “Comparison of Adherence to Guideline-Based Cholesterol Treatment Goals in Men Versus Women,” *Am. J. Cardiol.*, vol. 117, no. 1, pp. 48–53, 2016, doi: 10.1016/j.amjcard.2015.10.007.
- [14] J. A. Moolman, “Unravelling the cardioprotective mechanism of action of estrogens,” *Cardiovasc. Res.*, vol. 69, no. 4, pp. 777–780, 2006, doi: 10.1016/j.cardiores.2006.01.001.
- [15] A. Iorga, C. M. Cunningham, S. Moazeni, G. Ruffenach, S. Umar, and M. Eghbali, “The protective role of estrogen and estrogen receptors in cardiovascular disease and the controversial use of estrogen therapy,” *Biol. Sex Differ.*, vol. 8, no. 1, p. 33, 2017, doi: 10.1186/s13293-017-0152-8.
- [16] G. Jia, M. A. Hill, and J. R. Sowers, “Diabetic cardiomyopathy: An update of mechanisms contributing to this clinical entity,” *Circ. Res.*, vol. 122, no. 4, pp. 624–638, 2018, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.311586.
- [17] O. Itzhaki Ben Zadok *et al.*, “Admission blood glucose and 10-year mortality among patients with or without pre-existing diabetes mellitus hospitalized with heart failure,” *Cardiovasc. Diabetol.*, vol. 16, no. 1, pp. 1–9, 2017, doi: 10.1186/s12933-017-0582-y.
- [18] X. Palomer, J. Pizarro-Delgado, and M. Vázquez-Carrera, “Emerging Actors in Diabetic Cardiomyopathy: Heartbreaker Biomarkers or Therapeutic

- Targets?," *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 39, no. 5, pp. 452–467, 2018, doi: 10.1016/j.tips.2018.02.010.
- [19] C. R. Chong, K. Clarke, and E. Levelt, "Metabolic remodelling in diabetic cardiomyopathy," *Cardiovasc. Res.*, vol. 113, no. 4, pp. 422–430, 2017, doi: 10.1093/cvr/cvx018.
- [20] N. Amaral and D. O. Okonko, "Metabolic abnormalities of the heart in type II diabetes," *Diabetes Vasc. Dis. Res.*, vol. 12, no. 4, pp. 239–248, 2015, doi: 10.1177/1479164115580936.
- [21] J. J. F. P. Luiken *et al.*, "Regulation of cardiac long-chain fatty acid and glucose uptake by translocation of substrate transporters," *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.*, vol. 448, no. 1, pp. 1–15, 2004, doi: 10.1007/s00424-003-1199-4.
- [22] N. A. Abumrad, I. J. Goldberg, and C. Biology, "CD36 actions in the Heart: lipids, calcium, inflammation, repair and more?," vol. 1860, no. 10, pp. 1442–1449, 2017, doi: 10.1016/j.bbalip.2016.03.015.CD36.
- [23] A. R. Aroor, T. H. Wideman, A. J. Zautra, and R. R. Edwards, "Insulin Resistance and Heart Failure: Molecular Mechanisms," vol. 154, no. 11, pp. 2262–2265, 2014, doi: 10.1016/j.pain.2013.06.005.Re-Thinking.
- [24] M. M. Sung, S. M. Hamza, and J. R. B. Dyck, "Myocardial Metabolism in Diabetic Cardiomyopathy: Potential Therapeutic Targets," *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 22, no. 17, pp. 1606–1630, 2015, doi: 10.1089/ars.2015.6305.
- [25] M. F. White *et al.*, "Mechanism by Which Fatty Acids Inhibit Insulin Activation of Insulin Receptor Substrate-1 (IRS-1)-associated Phosphatidylinositol 3-Kinase Activity in Muscle," *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 52, pp. 50230–50236, 2002, doi: 10.1074/jbc.m200958200.
- [26] X. Li *et al.*, "FGF21 ameliorates diabetic cardiomyopathy by activating the AMPK-paraoxonase 1 signaling axis in mice," *Clin. Sci.*, vol. 131, no. 15, pp. 1877–1893, 2017, doi: 10.1042/cs20170271.
- [27] A. J. Wilson, E. K. Gill, R. A. Abudalo, K. S. Edgar, C. J. Watson, and D. J.

- Grieve, “Reactive oxygen species signalling in the diabetic heart: Emerging prospect for therapeutic targeting,” *Heart*, vol. 0, no. 4, pp. 1–7, 2017, doi: 10.1136/heartjnl-2017-311448.
- [28] F. Giacco and M. Brownlee, “Oxidative stress and diabetic complications Ferdinando,” *NIH Public Access Author Manuscr.*, vol. 107, no. 9, pp. 1058–1070, 2011, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.223545.Oxidative.
- [29] Y. Yue, K. Meng, Y. Pu, and X. Zhang, “Transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) mediates cardiac fibrosis and induces diabetic cardiomyopathy,” *Diabetes Res. Clin. Pract.*, vol. 133, pp. 124–130, 2017, doi: 10.1016/j.diabres.2017.08.018.
- [30] D. M. Bers, “Calcium fluxes involved in control of cardiac myocyte contraction,” *Circ. Res.*, vol. 87, no. 4, pp. 275–281, 2000, doi: 10.1161/01.RES.87.4.275.
- [31] S. Nunes, “The role of inflammation in diabetic cardiomyopathy,” pp. 59–73, 2012.
- [32] A. Lopez-Candales, P. M. Hernández Burgos, D. F. Hernandez-Suarez, and D. Harris, “Linking Chronic Inflammation with Cardiovascular Disease: From Normal Aging to the Metabolic Syndrome,” *J. Nat. Sci.*, vol. 3, no. 4, 2017, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28670620><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5488800>.
- [33] J. Fang *et al.*, “Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs,” *Oncotarget*, vol. 9, no. 6, pp. 7204–7218, 2017, doi: 10.18632/oncotarget.23208.
- [34] J. Boucher, A. Kleinridders, and C. Ronald Kahn, “Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states,” *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 6, no. 1, 2014, doi: 10.1101/cshperspect.a009191.
- [35] F. Andreozzi *et al.*, “Interleukin-6 Impairs the Insulin Signaling Pathway, Promoting Production of Nitric Oxide in Human Umbilical Vein Endothelial

- Cells,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 27, no. 6, pp. 2372–2383, 2007, doi: 10.1128/mcb.01340-06.
- [36] D. Tousoulis *et al.*, “Diabetes Mellitus-Associated Vascular Impairment,” *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 62, no. 8, pp. 667–676, 2013, doi: 10.1016/j.jacc.2013.03.089.
- [37] G. M. Rubanyi, A. Johns, and K. Kauser, “Effect of estrogen on endothelial function and angiogenesis,” *Vascul. Pharmacol.*, vol. 38, no. 2, pp. 89–98, 2002, doi: 10.1016/S0306-3623(02)00131-3.
- [38] N. C. Fredette, M. R. Meyer, and E. R. Prossnitz, “Role of GPER in estrogen-dependent nitric oxide formation and vasodilation,” *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, vol. 176, no. February 2017, pp. 65–72, 2018, doi: 10.1016/j.jsbmb.2017.05.006.
- [39] M. A. Maturana, M. C. Irigoyen, and P. M. Spritzer, “Menopause, estrogens, and endothelial dysfunction: current concepts,” *Clinics*, vol. 62, no. 1, pp. 77–86, 2007, doi: 10.1590/s1807-59322007000100012.
- [40] A. D. Baron *et al.*, “Type II Diabetes Abrogates Sex Differences in Endothelial Function in Premenopausal Women,” *Circulation*, vol. 101, no. 17, pp. 2040–2046, 2012, doi: 10.1161/01.cir.101.17.2040.
- [41] A. E. Stanhewicz, M. M. Wenner, and N. S. Stachenfeld, “Sex differences in endothelial function important to vascular health and overall cardiovascular disease risk across the lifespan,” *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.*, vol. 315, no. 6, pp. H1569–H1588, 2018, doi: 10.1152/ajpheart.00396.2018.
- [42] B. J. Deroo and K. S. and Korach, “Review series Estrogen receptors and human disease,” *J. Clin. Invest.*, vol. 116, no. 3, pp. 561–570, 2006, doi: 10.1172/JCI27987.Selective.
- [43] J. L. Labandeira-Garcia, A. I. Rodriguez-Perez, R. Valenzuela, M. A. Costa-Besada, and M. J. Guerra, “Menopause and Parkinson’s disease. Interaction between estrogens and brain renin-angiotensin system in dopaminergic

- degeneration,” *Front. Neuroendocrinol.*, vol. 43, pp. 44–59, 2016, doi: 10.1016/j.yfrne.2016.09.003.
- [44] M. R. Gubbels Bupp, “Sex, the aging immune system, and chronic disease,” *Cell. Immunol.*, vol. 294, no. 2, pp. 102–110, 2015, doi: 10.1016/j.cellimm.2015.02.002.
- [45] L. Björnström and M. Sjöberg, “Mechanisms of Estrogen Receptor Signaling: Convergence of Genomic and Nongenomic Actions on Target Genes,” *Mol. Endocrinol.*, vol. 19, no. 4, pp. 833–842, 2005, doi: 10.1210/me.2004-0486.
- [46] A. Ray, K. E. Prefontaine, and P. Ray, “Down-modulation of interleukin-6 gene expression by 17 $\beta$ -estradiol in the absence of high affinity DNA binding by the estrogen receptor,” *J. Biol. Chem.*, vol. 269, no. 17, pp. 12940–12946, 1994.
- [47] P. Vrtačnik, B. Ostanek, S. Mencej-Bedrač, and J. Marc, “The many faces of estrogen signaling,” *Biochem. Medica*, vol. 24, no. 3, pp. 329–342, 2014, doi: 10.11613/BM.2014.035.
- [48] L. H. Smith *et al.*, “Differential and opposing regulation of PAI-1 promoter activity by estrogen receptor  $\alpha$  and estrogen receptor  $\beta$  in endothelial cells,” *Circ. Res.*, vol. 95, no. 3, pp. 269–275, 2004, doi: 10.1161/01.RES.0000136521.70093.f1.
- [49] E. R. Prossnitz and M. Barton, “Estrogen biology: New insights into GPER function and clinical opportunities,” *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 389, no. 1–2, pp. 71–83, 2014, doi: 10.1016/j.mce.2014.02.002.
- [50] E. J. Filardo, J. A. Quinn, K. I. Bland, and A. R. Frackelton, “Estrogen-Induced Activation of Erk-1 and Erk-2 Requires the G Protein-Coupled Receptor Homolog, GPR30, and Occurs via Trans-Activation of the Epidermal Growth Factor Receptor through Release of HB-EGF,” *Mol. Endocrinol.*, vol. 14, no. 10, pp. 1649–1660, 2000, doi: 10.1210/mend.14.10.0532.
- [51] M. Barton, “The G protein-coupled estrogen receptor GPER in health and

- Nat Rev Endocrinol Author Manuscript . Author manuscript," vol. 7, no. 7, pp. 715–726, 2012, doi: 10.1038/nrendo.2011.122.The.
- [52] S. N. Romano and D. A. Gorelick, "Crosstalk between nuclear and G protein-coupled estrogen receptors," *Gen. Comp. Endocrinol.*, vol. 261, pp. 190–197, 2018, doi: 10.1016/j.ygcn.2017.04.013.
- [53] A. A. Gupte, H. J. Pownall, and D. J. Hamilton, "Estrogen: An Emerging Regulator of Insulin Action and Mitochondrial Function," *J. Diabetes Res.*, vol. 2015, pp. 1–9, 2015, doi: 10.1155/2015/916585.
- [54] C. M. Klinge, "Estrogens regulate life and death in mitochondria," *J. Bioenerg. Biomembr.*, vol. 49, no. 4, pp. 307–324, 2017, doi: 10.1007/s10863-017-9704-1.
- [55] B. Colom, J. Oliver, P. Roca, and F. J. Garcia-Palmer, "Caloric restriction and gender modulate cardiac muscle mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and oxidative damage," *Cardiovasc Res*, vol. 74, no. 3, pp. 456–465, 2007, doi: S0008-6363(07)00057-0 [pii] 10.1016/j.cardiores.2007.02.001.
- [56] E. Amengual-Cladera, I. Lladó, M. Gianotti, and A. M. Proenza, "Retroperitoneal white adipose tissue mitochondrial function and adiponectin expression in response to ovariectomy and 17 $\beta$ -estradiol replacement," *Steroids*, vol. 77, no. 6, pp. 659–665, 2012, doi: 10.1016/j.steroids.2012.02.012.
- [57] A. Nadal-Casellas, M. Bauzá-Thorbrügge, A. M. Proenza, M. Gianotti, and I. Lladó, "Sex-dependent differences in rat brown adipose tissue mitochondrial biogenesis and insulin signaling parameters in response to an obesogenic diet," *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 373, no. 1–2, pp. 125–135, 2013, doi: 10.1007/s11010-012-1481-x.
- [58] R. Justo, J. Boada, M. Frontera, J. Oliver, J. Bermúdez, and M. Gianotti, "Gender dimorphism in rat liver mitochondrial oxidative metabolism and biogenesis," *Am. J. Physiol. Physiol.*, vol. 289, no. 2, pp. C372–C378, 2005, doi: 10.1152/ajpcell.00035.2005.

- [59] A. Valle, R. Guevara, F. J. García-Palmer, P. Roca, and J. Oliver, “Sexual dimorphism in liver mitochondrial oxidative capacity is conserved under caloric restriction conditions,” *Am. J. Physiol. Physiol.*, vol. 293, no. 4, pp. C1302–C1308, 2007, doi: 10.1152/ajpcell.00203.2007.
- [60] A. Nadal-Casellas, E. Amengual-Cladera, A. M. Proenza, I. Lladó, and M. Gianotti, “Long-term high-fat-diet feeding impairs mitochondrial biogenesis in liver of male and female rats,” *Cell. Physiol. Biochem.*, vol. 26, no. 3, pp. 291–302, 2010, doi: 10.1159/000320552.
- [61] J. Oliver, P. Roca, B. Colom, A. Valle, M. Alcolea, and F. García-Palmer, “Skeletal Muscle of Female Rats Exhibit Higher Mitochondrial Mass and Oxidative-Phosphorylative Capacities Compared to Males,” *Cell. Physiol. Biochem.*, vol. 19, no. 1–4, pp. 205–212, 2007, doi: 10.1159/000099208.
- [62] R. Guevara, F. M. Santandreu, A. Valle, M. Gianotti, J. Oliver, and P. Roca, “Sex-dependent differences in aged rat brain mitochondrial function and oxidative stress,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 46, no. 2, pp. 169–175, 2009, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.09.035.
- [63] G. Capllonch-Amer *et al.*, “Estradiol stimulates mitochondrial biogenesis and adiponectin expression in skeletal muscle,” *J. Endocrinol.*, vol. 221, no. 3, pp. 391–403, 2014, doi: 10.1530/JOE-14-0008.
- [64] V. Saengsirisuwan, S. Pongseeda, M. Prasannarong, K. Vichaiwong, and C. Toskulkao, “Modulation of insulin resistance in ovariectomized rats by endurance exercise training and estrogen replacement,” *Metabolism.*, vol. 58, no. 1, pp. 38–47, 2009, doi: 10.1016/j.metabol.2008.08.004.
- [65] W. Sutham *et al.*, “Ovariectomy and obesity have equal impact in causing mitochondrial dysfunction and impaired skeletal muscle contraction in rats,” *Menopause*, vol. 25, no. 12, pp. 1448–1458, 2018, doi: 10.1097/GME.0000000000001149.
- [66] M. G. Latour, M. Shinoda, and J. M. Lavoie, “Metabolic effects of physical training in ovariectomized and hyperestrogenic rats,” *Int. J. Obes.*, vol. 26,



- no. 3, pp. 335–343, 2002, doi: 10.1038/sj.ijo.0801900.
- [67] L. Angeles, S. Raffaele-roma, and P. A. Gemelli, “Hormones and cardiovascular health in women,” vol. 12, no. 5, pp. 483–497, 2006, doi: 10.1093/humupd/dml028.
- [68] F. Naftolin, J. Friedenthal, R. Nachtigall, and L. Nachtigall, “Cardiovascular health and the menopausal woman: the role of estrogen and when to begin and end hormone treatment,” *F1000Research*, vol. 8, p. 1576, 2019, doi: 10.12688/f1000research.15548.1.
- [69] J. M. Mehta, R. C. Chester, and J. M. Kling, “The Timing Hypothesis: Hormone Therapy for Treating Symptomatic Women during Menopause and Its Relationship to Cardiovascular Disease,” *J. Women’s Heal.*, vol. 28, no. 5, pp. 705–711, 2019, doi: 10.1089/jwh.2018.7201.
- [70] A. Gastaldelli and M. Gaggini, “Ectopic fat: a target for cardiometabolic risk management,” *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.*, vol. 14, no. 12, pp. 1301–1303, 2016, doi: 10.1080/14779072.2016.1256773.
- [71] G. Marín-Royo *et al.*, “The Impact of Cardiac Lipotoxicity on Cardiac Function and Mirnas Signature in Obese and Non-Obese Rats with Myocardial Infarction,” *Sci. Rep.*, vol. 9, no. 1, pp. 1–11, 2019, doi: 10.1038/s41598-018-36914-y.
- [72] G. Marin-Royo *et al.*, “Inhibition of galectin-3 ameliorates the consequences of cardiac lipotoxicity in a rat model of diet-induced obesity,” *DMM Dis. Model. Mech.*, vol. 11, no. 2, 2018, doi: 10.1242/dmm.032086.
- [73] K. M. Wu *et al.*, “High-density lipoprotein ameliorates palmitic acid-induced lipotoxicity and oxidative dysfunction in H9c2 cardiomyoblast cells via ROS suppression,” *Nutr. Metab.*, vol. 16, no. 1, pp. 1–13, 2019, doi: 10.1186/s12986-019-0356-5.
- [74] A. Wende R and E. Dale Abel, “Lipotoxicity in the Heart Adam,” vol. 1801, no. 3, pp. 311–319, 2010, doi: 10.1016/j.cortex.2009.08.003.Predictive.
- [75] M. Zamora and J. A. Villena, “Contribution of Impaired Insulin Signaling to

- the Pathogenesis of Diabetic Cardiomyopathy,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 11, pp. 1–16, 2019, doi: 10.3390/ijms20112833.
- [76] R. Dhananjayan, K. S. S. Koundinya, T. Malati, and V. K. Kutala, “Endothelial Dysfunction in Type 2 Diabetes Mellitus,” *Indian J. Clin. Biochem.*, vol. 31, no. 4, pp. 372–379, 2016, doi: 10.1007/s12291-015-0516-y.
- [77] C. H. Hubscher, D. L. Brooks, and J. R. Johnson, “A quantitative method for assessing stages of the rat estrous cycle,” *Biotech. Histochem.*, vol. 80, no. 2, pp. 79–87, 2005, doi: 10.1080/10520290500138422.
- [78] Y. Berthois, J. A. Katzenellenbogen, and B. S. Katzenellenbogen, “Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture.,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 83, no. 8, pp. 2496–2500, 1986, doi: 10.1073/pnas.83.8.2496.
- [79] M. M. Bradford, “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding,” *Anal. Biochem.*, vol. 72, no. 1–2, pp. 248–254, 1976, doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- [80] K. L. Quick, J. I. Hardt, and L. L. Dugan, “Rapid microplate assay for superoxide scavenging efficiency,” *J. Neurosci. Methods*, vol. 97, no. 2, pp. 139–144, 2000, doi: 10.1016/S0165-0270(00)00179-5.
- [81] M. H. Hadwan and H. N. Abed, “Data supporting the spectrophotometric method for the estimation of catalase activity,” *Data Br.*, vol. 6, pp. 194–199, 2016, doi: 10.1016/j.dib.2015.12.012.
- [82] L. Goth, “A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range,” *Clin. Chim. Acta*, vol. 196, pp. 143–151, 1991, doi: 10.1016/0009-8981(91)90067-M.
- [83] C. Weigt *et al.*, “Effects of estradiol, estrogen receptor subtype-selective agonists and genistein on glucose metabolism in leptin resistant female Zucker diabetic fatty (ZDF) rats,” *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, vol. 154, pp. 12–22, 2015, doi: 10.1016/j.jsbmb.2015.06.002.

- [84] R. J. Parks, O. Bogachev, M. Mackasey, G. Ray, R. A. Rose, and S. E. Howlett, “The impact of ovariectomy on cardiac excitation-contraction coupling is mediated through cAMP/PKA-dependent mechanisms,” *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol. 111, pp. 51–60, 2017, doi: 10.1016/j.yjmcc.2017.07.118.
- [85] P. López-Jaramillo *et al.*, “The role of leptin/adiponectin ratio in metabolic syndrome and diabetes,” *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.*, vol. 18, no. 1, pp. 37–45, Apr. 2014, doi: 10.1515/hmbci-2013-0053.
- [86] K. E. Leffler and A. A. Abdel-Rahman, “Estrogen-dependent disruption of adiponectin-connexin43 signaling underlies exacerbated myocardial dysfunction in diabetic female rats,” *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 368, no. 2, pp. 208–217, 2019, doi: 10.1124/jpet.118.254029.
- [87] A. Moore *et al.*, “Rapid onset of cardiomyopathy in STZ-induced female diabetic mice involves the downregulation of pro-survival Pim-1,” *Cardiovasc. Diabetol.*, vol. 13, no. 1, pp. 1–12, 2014, doi: 10.1186/1475-2840-13-68.
- [88] H. L. Xu, V. L. Baughman, and D. A. Pelligrino, “Estrogen replacement treatment in diabetic ovariectomized female rats potentiates postischemic leukocyte adhesion in cerebral venules,” *Stroke*, vol. 35, no. 8, pp. 1974–1978, 2004, doi: 10.1161/01.STR.0000135016.24349.9F.
- [89] S. Li *et al.*, “Novel and traditional lipid-related biomarkers and their combinations in predicting coronary severity,” *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–10, 2017, doi: 10.1038/s41598-017-00499-9.
- [90] Q. Han, S. C. Yeung, M. S. M. Ip, and J. C. W. Mak, “Dysregulation of cardiac lipid parameters in high-fat high-cholesterol diet-induced rat model,” *Lipids Health Dis.*, vol. 17, no. 1, pp. 1–10, 2018, doi: 10.1186/s12944-018-0905-3.
- [91] J. D. Schofield, Y. Liu, P. Rao-Balakrishna, R. A. Malik, and H. Soran, “Diabetes Dyslipidemia,” *Diabetes Ther.*, vol. 7, no. 2, pp. 203–219, 2016, doi: 10.1007/s13300-016-0167-x.

- [92] C. Camara *et al.*, “Effect of ovariectomy on serum adiponectin levels and visceral fat in rats,” *J. Huazhong Univ. Sci. Technol. - Med. Sci.*, vol. 34, no. 6, pp. 825–829, 2014, doi: 10.1007/s11596-014-1360-7.
- [93] P. Babaei, A. Dastras, B. S. Tehrani, and S. Pourali Roudbaneh, “The Effect of Estrogen Replacement Therapy on Visceral Fat, Serum Glucose, Lipid Profiles and Apelin Level in Ovariectomized Rats,” *J. Menopausal Med.*, vol. 23, no. 3, p. 182, 2017, doi: 10.6118/jmm.2017.23.3.182.
- [94] M. Bayeva, K. T. Sawicki, and H. Ardehali, “Taking diabetes to heart--deregulation of myocardial lipid metabolism in diabetic cardiomyopathy.,” *J. Am. Heart Assoc.*, vol. 2, no. 6, pp. 1–18, 2013, doi: 10.1161/JAHA.113.000433.
- [95] Ding An and Brian Rodrigues, “Role of changes in cardiac metabolism in development of diabetic cardiomyopathy,” *Am J Physiol Hear. Circ Physiol* 291, vol. 291, pp. H1489–H1506, 2006, doi: 10.1152/ajpheart.00278.2006.
- [96] C. Montessuit and R. Lerch, “Regulation and dysregulation of glucose transport in cardiomyocytes,” *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, vol. 1833, no. 4. Elsevier B.V., pp. 848–856, 2013, doi: 10.1016/j.bbamcr.2012.08.009.
- [97] H. Bugger and E. Dale Abel, “Molecular mechanisms for myocardial mitochondrial dysfunction in the metabolic syndrome,” *Clin. Sci.*, vol. 114, no. 3, pp. 195–210, 2008, doi: 10.1042/CS20070166.
- [98] A. E. Achari and S. K. Jain, “Adiponectin, a therapeutic target for obesity, diabetes, and endothelial dysfunction,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 18, no. 6, 2017, doi: 10.3390/ijms18061321.
- [99] L. D. Høeg *et al.*, “Adiponectin concentration is associated with muscle insulin sensitivity, AMPK phosphorylation, and ceramide content in skeletal muscles of men but not women.,” *J. Appl. Physiol.*, vol. 114, no. 5, pp. 592–601, 2013, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23305978>.

- [100] S. S. Deepa and L. Q. Dong, “APPL1 : role in adiponectin signaling and beyond,” no. 116, pp. 22–36, 2009, doi: 10.1152/ajpendo.90731.2008.
- [101] Y. Lustig, R. Hemi, and H. Kanety, *Regulation and Function of Adiponectin Receptors in Skeletal Muscle*, 1st ed., vol. 90. Elsevier Inc., 2012.
- [102] F. Lizcano and G. Guzmán, “Estrogen deficiency and the origin of obesity during menopause,” *Biomed Res. Int.*, vol. 2014, 2014, doi: 10.1155/2014/757461.
- [103] M. F. Landecho, C. Tuero, V. Valentí, I. Bilbao, M. de la Higuera, and G. Frühbeck, “Relevance of Leptin and Other Adipokines in Obesity-Associated Cardiovascular Risk,” *Nutrients*, vol. 11, no. 11, pp. 1–16, 2019, doi: 10.3390/nu11112664.
- [104] J. G. Duncan, “Mitochondrial dysfunction in diabetic cardiomyopathy,” *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1813, no. 7, pp. 1351–1359, 2011, doi: 10.1016/j.bbamcr.2011.01.014.
- [105] J. Szendroedi, E. Phielix, and M. Roden, “The role of mitochondria in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus,” *Nat. Rev. Endocrinol.*, vol. 8, no. 2, pp. 92–103, 2012, doi: 10.1038/nrendo.2011.138.
- [106] N. Fillmore, J. Mori, and G. D. Lopaschuk, “Mitochondrial fatty acid oxidation alterations in heart failure , ischaemic heart disease and diabetic cardiomyopathy,” 2014, doi: 10.1111/bph.12475.
- [107] E. Boudina, S; Sena, S; Theobald, H; Sheng, X; Wright, J; Hu, X; Aziz, S; Johnson, J; Bugger, H; Zaha, V; Abel, “Mitochondrial Energetics in the Heart in Obesity-Related Diabetes,” *Journal.9Med.Net*, vol. 56, no. 10, p. 2457, 2007, doi: 10.2337/db07-0481.
- [108] B. K. Smith *et al.*, “Submaximal ADP-stimulated respiration is impaired in ZDF rats and recovered by resveratrol,” *J. Physiol.*, vol. 591, no. 23, pp. 6089–6101, 2013, doi: 10.1113/jphysiol.2013.259226.
- [109] M. Labieniec-Watala, K. Siewiera, and Z. Jozwiak, “Resorcylicidene aminoguanidine (RAG) improves cardiac mitochondrial bioenergetics

- impaired by hyperglycaemia in a model of experimental diabetes,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 12, no. 11, pp. 8013–8026, 2011, doi: 10.3390/ijms12118013.
- [110] A. Pagliarani, S. Nesci, and V. Ventrella, “Modifiers of the oligomycin sensitivity of the mitochondrial F1F0-ATPase,” *Mitochondrion*, vol. 13, no. 4, pp. 312–319, 2013, doi: 10.1016/j.mito.2013.04.005.
- [111] R. A. Busiello, S. Savarese, and A. Lombardi, “Mitochondrial uncoupling proteins and energy metabolism,” *Frontiers in Physiology*, vol. 6, no. FEB. p. 36, 2015, doi: 10.3389/fphys.2015.00036.
- [112] S. Cadenas, “Mitochondrial uncoupling, ROS generation and cardioprotection,” *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.*, vol. 1859, no. 9, pp. 940–950, 2018, doi: 10.1016/j.bbabbio.2018.05.019.
- [113] H. Raza, A. John, and F. C. Howarth, “Alterations in glutathione redox metabolism, oxidative stress, and mitochondrial function in the left ventricle of elderly zucker diabetic fatty rat heart,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 13, no. 12, pp. 16241–16254, 2012, doi: 10.3390/ijms131216241.
- [114] X. Yu, L. Ge, L. Niu, X. Lian, H. Ma, and L. Pang, “The dual role of inducible nitric oxide synthase in myocardial ischemia/reperfusion injury: Friend or foe?,” *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2018, 2018, doi: 10.1155/2018/8364848.
- [115] D. Tekin, A. D. Dursun, and L. Xi, “Hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) and cardioprotection,” *Acta Pharmacol. Sin.*, vol. 31, no. 9, pp. 1085–1094, 2010, doi: 10.1038/aps.2010.132.
- [116] A. J. Majmundar, W. J. Wong, and M. C. Simon, “Hypoxia-Inducible Factors and the Response to Hypoxic Stress,” *Mol. Cell*, vol. 40, no. 2, pp. 294–309, 2010, doi: 10.1016/j.molcel.2010.09.022.
- [117] A. De Jesus, H.-C. Chang, and H. Ardehali, “Metabolic Suppression of HIF-1 $\alpha$  Contributes to Susceptibility of Ischemic Injury in Diabetic Hearts,” *JACC Basic to Transl. Sci.*, vol. 3, no. 4, pp. 499–502, 2018, doi: 10.1016/j.jacabts.2018.07.001.

- [118] P. Shamhart *et al.*, “Hyperglycemia enhances function and differentiation of adult rat cardiac fibroblasts,” *Can J Physiol Pharmacol*, vol. 92, no. 7, pp. 598–604, 2014, doi: 10.1139/cjpp-2013-0490.
- [119] C. Ying *et al.*, “Glucose variability aggravates cardiac fibrosis by altering AKT signalling path,” *Diabetes Vasc. Dis. Res.*, vol. 14, no. 4, pp. 327–335, 2017, doi: 10.1177/1479164117698917.
- [120] I. Russo and N. G. Frangogiannis, “Diabetes-associated cardiac fibrosis: cellular effectors, molecular mechanisms and therapeutic opportunities,” *U.S. Dep. Heal. Hum. Serv.*, vol. 90, pp. 84–93, 2017, doi: 10.1016/j.yjmcc.2015.12.011.Diabetes-associated.
- [121] B. E. Sobel, D. J. Schneider, Y. H. Lee, and R. E. Pratley, “Insulin resistance increases PAI-1 in the heart,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 346, no. 1, pp. 102–107, 2006, doi: 10.1016/j.bbrc.2006.05.078.
- [122] W. Chengji and F. Xianjin, “Treadmill exercise alleviates diabetic cardiomyopathy by suppressing plasminogen activator inhibitor expression and enhancing eNOS in streptozotocin-induced male diabetic rats,” *Endocr. Connect.*, p. EC-18-0060, 2018, doi: 10.1530/EC-18-0060.
- [123] N. Nakayama, T. Nakamura, H. Okada, S. Iwaki, B. E. Sobel, and S. Fujii, “Modulators of induction of plasminogen activator inhibitor type-1 in HepG2 cells by transforming growth factor- $\beta$ ,” *Coron. Artery Dis.*, vol. 22, no. 7, pp. 468–478, 2011, doi: 10.1097/MCA.0b013e32834a3817.
- [124] D. E. Vaughan, “PAI-1 and TGF- $\beta$ ,” *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 26, no. 4, pp. 679–680, 2006, doi: 10.1161/01.atv.0000209949.86606.c2.
- [125] M. Sbert-Roig *et al.*, “GPER mediates the effects of 17 $\beta$ -estradiol in cardiac mitochondrial biogenesis and function,” *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 420, pp. 116–124, 2016, doi: 10.1016/j.mce.2015.11.027.
- [126] H. Azizian, M. Khaksari, G. Asadi karam, M. Esmailidehaj, and Z. Farhadi, “Cardioprotective and anti-inflammatory effects of G-protein coupled receptor 30 (GPR30) on postmenopausal type 2 diabetic rats,” *Biomed.*

- Pharmacother.*, vol. 108, no. September, pp. 153–164, 2018, doi: 10.1016/j.biopha.2018.09.028.
- [127] R. D. Feldman, “Heart disease in women: Unappreciated challenges, GPER as a new target,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 17, no. 5. pp. 1–8, 2016, doi: 10.3390/ijms17050760.
- [128] K. E. Davis, E. J. Carstens, B. G. Irani, L. M. Gent, L. M. Hahner, and D. J. Clegg, “Sexually dimorphic role of G protein-coupled estrogen receptor (GPER) in modulating energy homeostasis,” *Horm. Behav.*, vol. 66, no. 1, pp. 196–207, 2014, doi: <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2014.02.004>.
- [129] W. Minta *et al.*, “Estrogen deprivation aggravates cardiometabolic dysfunction in obese-insulin resistant rats through the impairment of cardiac mitochondrial dynamics,” *Exp. Gerontol.*, vol. 103, no. November 2017, pp. 107–114, 2018, doi: 10.1016/j.exger.2018.01.006.
- [130] S. H. Tawfik, B. F. Mahmoud, M. I. Saad, M. Shehata, M. A. Kamel, and M. H. Helmy, “Similar and additive effects of ovariectomy and diabetes on insulin resistance and lipid metabolism,” *Biochem. Res. Int.*, vol. 2015, 2015, doi: 10.1155/2015/567945.
- [131] M. K. Fahmy, H. G. Sayyed, E. A. Abd Elrahim, and R. T. A. Farag, “Superimposed effect of ovariectomy on type 2 diabetes mellitus in Wistar rats,” *Alexandria J. Med.*, vol. 54, no. 2, pp. 129–137, 2018, doi: 10.1016/j.ajme.2017.05.011.
- [132] R. Bergeron, J. S. Mentor, I. Côté, T. Ngo Sock, R. Rabasa-Lhoret, and J. M. Lavoie, “Loss of ovarian estrogens causes only mild deterioration of glucose homeostasis in female ZDF rats preventable by voluntary running exercise,” *Horm. Metab. Res.*, vol. 46, no. 11, pp. 774–781, 2014, doi: 10.1055/s-0034-1381980.
- [133] K. D’Souza, C. Nzirorera, and P. C. Kienesberger, “Lipid metabolism and signaling in cardiac lipotoxicity,” *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids*, vol. 1861, no. 10, pp. 1513–1524, 2016, doi:



- 10.1016/j.bbalip.2016.02.016.
- [134] H. Nishi, T. Higashihara, and R. Inagi, “Lipotoxicity in kidney, heart, and skeletal muscle dysfunction,” *Nutrients*, vol. 11, no. 7, pp. 1–17, 2019, doi: 10.3390/nu11071664.
- [135] O. Ilkun and S. Boudina, “Cardiac Dysfunction and Oxidative Stress in the Metabolic Syndrome: an Update on Antioxidant Therapies,” *Curr. Pharm. Des.*, vol. 19, no. 27, pp. 4806–4817, 2013.
- [136] L. D. Ly *et al.*, “Oxidative stress and calcium dysregulation by palmitate in type 2 diabetes,” *Exp. Mol. Med.*, vol. 49, no. 2, pp. e291–e291, 2017, doi: 10.1038/emm.2016.157.
- [137] M. Tarvainen, J. P. Suomela, and H. Kallio, “Ultra high performance liquid chromatography-mass spectrometric analysis of oxidized free fatty acids and acylglycerols,” *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, vol. 113, no. 4, pp. 409–422, 2011, doi: 10.1002/ejlt.201000454.
- [138] A. Akoumi, T. Haffar, M. Moustjerji, R. S. Kiss, and N. Bousette, “Palmitate mediated diacylglycerol accumulation causes endoplasmic reticulum stress, Plin2 degradation, and cell death in H9C2 cardiomyoblasts,” *Exp. Cell Res.*, vol. 354, no. 2, pp. 85–94, 2017, doi: 10.1016/j.yexcr.2017.03.032.
- [139] J. Kuzmivic *et al.*, “Trimetazidine prevents palmitate-induced mitochondrial fission and dysfunction in cultured cardiomyocytes,” *Biochem. Pharmacol.*, vol. 91, no. 3, pp. 323–336, 2014, doi: 10.1016/j.bcp.2014.07.022.
- [140] M. Sbert-Roig *et al.*, “GPER mediates the effects of 17 $\beta$ -estradiol in cardiac mitochondrial biogenesis and function,” *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 420, pp. 116–124, 2016, doi: 10.1016/j.mce.2015.11.027.
- [141] G. W. Dorn, R. B. Vega, and D. P. Kelly, “Mitochondrial biogenesis and dynamics in the developing and diseased heart,” *Genes Dev.*, vol. 29, no. 19, pp. 1981–1991, 2015, doi: 10.1101/gad.269894.115.
- [142] G. C. Rowe, A. Jiang, and Z. Arany, “PGC-1 coactivators in cardiac development and disease,” *Circ. Res.*, vol. 107, no. 7, pp. 825–838, 2010,

- doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.223818.
- [143] C. D. Wei, Y. Li, H. Y. Zheng, Y. Q. Tong, and W. Dai, "Palmitate induces H9c2 cell apoptosis by increasing reactive oxygen species generation and activation of the ERK1/2 signaling pathway," *Mol. Med. Rep.*, vol. 7, no. 3, pp. 855–861, 2013, doi: 10.3892/mmr.2013.1276.
- [144] E. Ramírez *et al.*, "Eplerenone attenuated cardiac steatosis, apoptosis and diastolic dysfunction in experimental type-II diabetes," *Cardiovasc. Diabetol.*, vol. 12, no. 1, 2013, doi: 10.1186/1475-2840-12-172.
- [145] P. Puthanveetil *et al.*, "Cardiac triglyceride accumulation following acute lipid excess occurs through activation of a FoxO1-iNOS-CD36 pathway," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 51, no. 2, pp. 352–363, 2011, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.04.009.
- [146] M. Park, A. Sabetski, Y. Kwan Chan, S. Turdi, and G. Sweeney, "Palmitate Induces ER Stress and Autophagy in H9c2 Cells: Implications for Apoptosis and Adiponectin Resistance," *J. Cell. Physiol.*, vol. 230, no. 3, pp. 630–639, 2015, doi: 10.1002/jcp.24781.
- [147] J. Patková, M. Anděl, and J. Trnka, "Palmitate-induced cell death and mitochondrial respiratory dysfunction in myoblasts are not prevented by mitochondria-targeted antioxidants," *Cell. Physiol. Biochem.*, vol. 33, no. 5, pp. 1439–1451, 2014, doi: 10.1159/000358709.
- [148] C. J. Liu *et al.*, "Akt mediates 17 $\beta$ -estradiol and/or estrogen receptor- $\alpha$  inhibition of LPS-induced tumor necrosis factor- $\alpha$  expression and myocardial cell apoptosis by suppressing the JNK1/2-NF $\kappa$ B pathway," *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 13, no. 9 B, pp. 3655–3667, 2009, doi: 10.1111/j.1582-4934.2009.00669.x.
- [149] F. Fortini *et al.*, "Estrogen receptor  $\beta$ -dependent Notch1 activation protects vascular endothelium against tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ )-induced apoptosis," *J. Biol. Chem.*, vol. 292, no. 44, pp. 18178–18191, 2017, doi: 10.1074/jbc.M117.790121.

- [150] J. Y. Kong and S. W. Rabkin, "Palmitate-induced apoptosis in cardiomyocytes is mediated through alterations in mitochondria: Prevention by cyclosporin A," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids*, vol. 1485, no. 1, pp. 45–55, 2000, doi: 10.1016/S1388-1981(00)00028-7.
- [151] E. P. Taddeo *et al.*, "Opening of the mitochondrial permeability transition pore links mitochondrial dysfunction to insulin resistance in skeletal muscle," *Mol. Metab.*, vol. 3, no. 2, pp. 124–134, 2014, doi: 10.1016/j.molmet.2013.11.003.
- [152] Waage *et al.*, "The Critical Role of Akt in Cardiovascular Function Prasanna," *Physiol. Behav.*, vol. 176, no. 1, pp. 139–148, 2017, doi: 10.1016/j.vph.2015.05.008.The.
- [153] W. Han, M. Ming, T. C. He, and Y. Y. He, "Immunosuppressive cyclosporin A activates AKT in keratinocytes through PTEN suppression: Implications in skin carcinogenesis," *J. Biol. Chem.*, vol. 285, no. 15, pp. 11369–11377, 2010, doi: 10.1074/jbc.M109.028142.
- [154] S. R. Burstain, H. Jeon Kim, and J. A. Fels, "Estrogens Receptor Beta Modelates Permetability Transitio in Brain Mitochondria," *Physiol. Behav.*, vol. 176, no. 3, pp. 139–148, 2019, doi: 10.1016/j.bbabbio.2018.03.006.Estrogen.
- [155] H. Yao, X. Han, and X. Han, "The Cardioprotection of the Insulin-Mediated PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway," *Am. J. Cardiovasc. Drugs*, vol. 14, no. 6, pp. 433–442, 2014, doi: 10.1007/s40256-014-0089-9.
- [156] C. M. Sena, F. Carrilho, and R. M. Seïça, "Endothelial Dysfunction in Type 2 Diabetes: Targeting Inflammation," *Endothel. Dysfunct. - Old Concepts New Challenges*, 2018, doi: 10.5772/intechopen.76994.
- [157] C. Manrique, G. Lastra, and J. R. Sowers, "New insights into insulin action and resistance in the vasculature," vol. 1311, no. 1, pp. 138–150, 2014, doi: 10.1038/mp.2011.182.doi.
- [158] T. Kobayashi and K. Kamata, "Short-term insulin treatment and aortic

- expressions of IGF-1 receptor and VEGF mRNA in diabetic rats,” *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.*, vol. 283, no. 5, pp. H1761–H1768, 2015, doi: 10.1152/ajpheart.00248.2002.
- [159] S. M. Craige *et al.*, “PGC-1 $\alpha$  dictates endothelial function through regulation of eNOS expression,” *Sci. Rep.*, vol. 6, pp. 1–9, 2016, doi: 10.1038/srep38210.
- [160] A. Jain, C. Coffey, V. Mehrotra, and J. Flammer, “Endothelin-1 traps as a potential therapeutic tool: from diabetes to beyond?,” *Drug Discov. Today*, vol. 24, no. 9, pp. 1937–1942, 2019, doi: 10.1016/j.drudis.2019.07.008.
- [161] A. S. Bilsel, H. Moini, E. Tetik, F. Aksungar, B. Kaynak, and A. Özer, “17 $\beta$ -Estradiol modulates endothelin-1 expression and release in human endothelial cells,” *Cardiovasc. Res.*, vol. 46, no. 3, pp. 579–584, 2000, doi: 10.1016/S0008-6363(00)00046-8.
- [162] R. K. Dubey, E. K. Jackson, P. J. Keller, B. Imthurn, and M. Rosselli, “Estradiol Metabolites Inhibit Endothelin Synthesis by an Estrogen Receptor-Independent Mechanism,” *Hypertension*, vol. 37, no. 2, pp. 640–644, 2012, doi: 10.1161/01.hyp.37.2.640.
- [163] R. Cerychova and G. Pavlinkova, “HIF-1, metabolism, and diabetes in the embryonic and adult heart,” *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, vol. 9, no. AUG, pp. 1–14, 2018, doi: 10.3389/fendo.2018.00460.
- [164] Y. Shi and P. M. Vanhoutte, “Macro- and microvascular endothelial dysfunction in diabetes,” *J. Diabetes*, vol. 9, no. 5, pp. 434–449, 2017, doi: 10.1111/1753-0407.12521.
- [165] E. Chou *et al.*, “Decreased Cardiac Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and Its Receptors in Insulin-Resistant and Diabetic States,” *Circulation*, vol. 105, no. 3, pp. 373–379, 2002, doi: 10.1161/hc0302.102143.
- [166] T. N. Crawford, D. V. Alfaro, J. B. Kerrison, and E. P. Jablon, “Diabetic retinopathy and angiogenesis,” *Curr. Diabetes Rev.*, vol. 5, no. 1, pp. 8–13,

- 2009, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19199892>.
- [167] T. Nakagawa, T. Kosugi, and M. Haneda, “Angiogenesis in Diabetic Nephropathy,” *Semin. Nephrol.*, vol. 27, no. 2, pp. 161–171, 2009, doi: 10.1016/j.semnephrol.2007.01.007.
- [168] U. A. Okonkwo and L. A. Dipietro, “Diabetes and wound angiogenesis,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 18, no. 7, pp. 1–15, 2017, doi: 10.3390/ijms18071419.
- [169] J. Davignon and P. Ganz, “Role of Endothelial Dysfunction in Atherosclerosis,” *Angiology*, p. 000331971665462, 2016, doi: 10.1177/0003319716654627.
- [170] Q. Li, Y. Lin, S. Wang, L. Zhang, and L. Guo, “GLP-1 Inhibits High-Glucose-Induced Oxidative Injury of Vascular Endothelial Cells,” *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–9, 2017, doi: 10.1038/s41598-017-06712-z.
- [171] B. Khan, D. G. Harrison, M. T. Olbrych, R. W. Alexander, and R. M. Medford, “Nitric oxide regulates vascular cell adhesion molecule 1 gene expression and redox-sensitive transcriptional events in human vascular endothelial cells,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 93, no. 17, pp. 9114–9, 1996, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8799163><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC38604>.
- [172] P. Berillis, “The Role of Collagen in the Aorta’s Structure,” *Open Circ. Vasc. J.*, vol. 6, no. 1, pp. 1–8, 2013, doi: 10.2174/1877382601306010001.
- [173] E. Pardali, G. Sanchez-Duffhues, M. C. Gomez-Puerto, and P. ten Dijke, “TGF- $\beta$ -induced endothelial-mesenchymal transition in fibrotic diseases,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 18, no. 10, 2017, doi: 10.3390/ijms18102157.
- [174] T.-H. Lan, X.-Q. Huang, and H.-M. Tan, “Vascular fibrosis in atherosclerosis,” *Cardiovasc. Pathol.*, vol. 22, no. 5, pp. 401–407, 2013, doi: <https://doi.org/10.1016/j.carpath.2013.01.003>.
- [175] S. N. Y. Yang, M. L. Burch, L. R. Tannock, S. Evanko, N. Osman, and P. J. Little,

- “Transforming growth factor- $\beta$  regulation of proteoglycan synthesis in vascular smooth muscle: Contribution to lipid binding and accelerated atherosclerosis in diabetes,” *J. Diabetes*, vol. 2, no. 4, pp. 233–242, 2010, doi: 10.1111/j.1753-0407.2010.00089.x.
- [176] A.-M. Kampoli, D. Tousoulis, A. Briasoulis, G. Latsios, N. Papageorgiou, and C. Stefanadis, “Potential Pathogenic Inflammatory Mechanisms of Endothelial Dysfunction Induced by Type 2 Diabetes Mellitus,” *Curr. Pharm. Des.*, vol. 17, no. 37, pp. 4147–4158, 2012, doi: 10.2174/138161211798764825.
- [177] G. L. King, K. Park, and Q. Li, “Selective insulin resistance and the development of cardiovascular diseases in diabetes: The 2015 Edwin Bierman Award Lecture,” *Diabetes*, vol. 65, no. 6, pp. 1462–1471, 2016, doi: 10.2337/db16-0152.
- [178] X. An *et al.*, “Mesenchymal stem cells ameliorated glucolipotoxicity in HUVECs through TSG-6,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 17, no. 4, pp. 1–14, 2016, doi: 10.3390/ijms17040483.
- [179] D. Somjen, C. J. Paller, B. Gayer, F. Kohen, E. Knoll, and N. Stern, “High glucose blocks the effects of estradiol on human vascular cell growth: Differential interaction with estradiol and raloxifene,” *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, vol. 88, no. 1, pp. 101–110, 2004, doi: 10.1016/j.jsbmb.2003.11.002.
- [180] S. Tsalamandris, A. S. Antonopoulos, E. Oikonomou, G. Papamikroulis, and G. Vogiatzi, “Risk Factors and Cardiovascular Disease Prevention The Role of Inflammation in Diabetes : Current Concepts and Future Perspectives,” *Eur. Cardiol. Rev.*, vol. 14, no. 1, pp. 50–59, 2019.
- [181] M. S. Ellulu, I. Patimah, H. Khaza’ai, A. Rahmat, and Y. Abed, “Obesity & inflammation: The linking mechanism & the complications,” *Arch. Med. Sci.*, vol. 13, no. 4, pp. 851–863, 2017, doi: 10.5114/aoms.2016.58928.
- [182] X. Xiang *et al.*, “17 $\beta$ -estradiol inhibits H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced senescence in HUVEC

- cells through upregulating SIRT3 expression and promoting autophagy,” *Biogerontology*, vol. 21, no. 5. pp. 549–557, 2020, doi: 10.1007/s10522-020-09868-w.
- [183] É. Cossette, I. Cloutier, K. Tardif, G. Donpierre, and J. F. Tanguay, “Estradiol inhibits vascular endothelial cells pro-inflammatory activation induced by C-reactive protein,” *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 373, no. 1–2, pp. 137–147, 2013, doi: 10.1007/s11010-012-1482-9.
- [184] S. Chakrabarti, O. Lekontseva, and S. T. Davidge, “Estrogen is a modulator of vascular inflammation,” *IUBMB Life*, vol. 60, no. 6, pp. 376–382, 2008, doi: 10.1002/iub.48.
- [185] M. Félétou, Y. Huang, and P. M. Vanhoutte, “Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products,” *Br. J. Pharmacol.*, vol. 164, no. 3, pp. 894–912, 2011, doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01276.x.
- [186] J. Qi, Q. Wu, Q. Cheng, X. Chen, M. Zhu, and C. Miao, “High Glucose Induces Endothelial COX2 and iNOS Expression via Inhibition of Monomethyltransferase SETD8 Expression,” *J. Diabetes Res.*, vol. 2020, 2020, doi: 10.1155/2020/2308520.
- [187] K. Habas and L. Shang, “Alterations in intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) in human endothelial cells,” *Tissue Cell*, vol. 54, no. June, pp. 139–143, 2018, doi: 10.1016/j.tice.2018.09.002.
- [188] M. J. López-Armada, R. R. Riveiro-Naveira, C. Vaamonde-García, and M. N. Valcárcel-Ares, “Mitochondrial dysfunction and the inflammatory response,” *Mitochondrion*, vol. 13, no. 2, p. 106–118, Mar. 2013, doi: 10.1016/j.mito.2013.01.003.
- [189] W. Peng *et al.*, “Mitochondrial Dysfunction in Atherosclerosis.,” *DNA Cell Biol.*, vol. 38, no. 7, pp. 597–606, Jul. 2019, doi: 10.1089/dna.2018.4552.
- [190] J. Wada and A. Nakatsuka, “Mitochondrial dynamics and mitochondrial dysfunction in diabetes,” *Acta Med. Okayama*, vol. 70, no. 3, pp. 151–158,

- 2016, doi: 10.17925/USE.2010.06.1.20.
- [191] M. D. Brand and D. G. Nicholls, "Assessing mitochondrial dysfunction in cells," *Biochem. J.*, vol. 437, no. 3, pp. 575.1-575, 2011, doi: 10.1042/BJ4370575u.
- [192] J. S. Bhatti, S. Kumar, M. Vijayan, G. K. Bhatti, and P. H. Reddy, "Therapeutic Strategies for Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in Age-Related Metabolic Disorders," *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, vol. 146, pp. 13–46, 2017, doi: 10.1016/bs.pmbts.2016.12.012.
- [193] J. Kotlinowski and A. Jozkowicz, "PPAR Gamma and Angiogenesis: Endothelial Cells Perspective," *J. Diabetes Res.*, vol. 2016, 2016, doi: 10.1155/2016/8492353.
- [194] W. S. Lee and J. Kim, "Peroxisome proliferator-activated receptors and the heart: Lessons from the past and future directions," *PPAR Res.*, vol. 2015, 2015, doi: 10.1155/2015/271983.
- [195] T. W. Lee, K. J. Bai, T. I. Lee, T. F. Chao, Y. H. Kao, and Y. J. Chen, "PPARs modulate cardiac metabolism and mitochondrial function in diabetes," *J. Biomed. Sci.*, vol. 24, no. 1, pp. 1–9, 2017, doi: 10.1186/s12929-016-0309-5.
- [196] J. Zhang, Y. Guo, W. Ge, X. Zhou, and M. Pan, "High glucose induces apoptosis of HUVECs in a mitochondria-dependent manner by suppressing hexokinase 2 expression," *Exp. Ther. Med.*, pp. 621–629, 2019, doi: 10.3892/etm.2019.7609.
- [197] J. M. Marcus and S. A. Andrabi, "Sirt3 regulation under cellular stress: Making sense of the ups and downs," *Front. Neurosci.*, vol. 12, no. NOV, pp. 1–8, 2018, doi: 10.3389/fnins.2018.00799.
- [198] H. na Zhang *et al.*, "Sirtuins family as a target in endothelial cell dysfunction: implications for vascular ageing," *Biogerontology*, vol. 21, no. 5, pp. 495–516, 2020, doi: 10.1007/s10522-020-09873-z.
- [199] M. D. Hirschey *et al.*, "SIRT3 deficiency and mitochondrial protein



- hyperacetylation accelerate the development of the metabolic syndrome,” *Mol. Cell*, vol. 44, no. 2, pp. 177–190, 2011, doi: 10.1016/j.molcel.2011.07.019.
- [200] E. Gerdtz and V. Regitz-Zagrosek, “Sex differences in cardiometabolic disorders,” *Nat. Med.*, vol. 25, no. 11, pp. 1657–1666, 2019, doi: 10.1038/s41591-019-0643-8.
- [201] A. K. Ahirwar, A. Jain, B. Goswami, M. K. Bhatnagar, and J. Bhattacharjee, “Imbalance between protective (adiponectin) and prothrombotic (Plasminogen Activator Inhibitor-1) adipokines in metabolic syndrome,” *Diabetes Metab. Syndr. Clin. Res. Rev.*, vol. 8, no. 3, pp. 152–155, 2014, doi: 10.1016/j.dsx.2014.04.035.



**Ara mateix**

*Serem allò que vulguem ser. Debades  
fugim del foc si el foc ens justifica.*

Miquel Martí i Pol

*L'àmbit de tots els àmbits, 1981*