



**Universitat de les  
Illes Balears**

Facultat de Ciències

**Memòria del Treball de Fi de Grau**

# Efecte de l'obesitat dietètica sobre alguns marcadors de biogènesi mitocondrial a l'aorta de rates mascle

Margalida Puigròs Serra

**Grau de Bioquímica**

Any acadèmic 2012-13

DNI de l'alumne: 43208050C

Treball tutelat per Magdalena Gianotti Bauzà  
Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut



S'autoritza la Universitat a incloure el meu treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació

Paraules clau del treball:

Obesitat, Biogènesi mitocondrial, Funcionalitat mitocondrial, Mitocondri, Aorta, PGC1 $\alpha$ , TFAM, COX IV, Dieta hiperlipídica (HFD), Malalties cardiovasculars



# ÍNDIX

---

<b>1. RESUM/ ABSTRACT</b> .....	<b>2</b>
<b>2. INTRODUCCIÓ</b> .....	<b>3</b>
2.1. EL MITOCONDRI	
2.1.1.Funció .....	3
2.1.2.Genoma mitocondrial .....	4
2.1.3.Biogènesi mitocondrial i la seva regulació .....	5
2.2. OBESITAT I MALALTIA CARDIOVASCULAR	
2.2.1.Dieta hiperlipídica i disfunció mitocondrial .....	7
2.2.2.Malalties cardiovasculars i disfunció endotelial .....	9
2.2.3. Característiques i metabolisme de l'aorta .....	10
<b>3. OBJECTIUS I PLANTEJAMENT EXPERIMENTAL</b> .....	<b>11</b>
<b>4. MATERIALS I MÈTODES</b> .....	<b>12</b>
4.1. Materials i reactius .....	12
4.2. Animals i grups experimentals .....	12
4.3. Processament de les mostres .....	13
4.4. Western-blot .....	14
4.5. Anàlisi estadístic .....	18
<b>5. RESULTATS I DISCUSSIÓ</b> .....	<b>19</b>
5.1. Paràmetres biomètrics .....	19
5.2. Marcadors de biogènesi mitocondrial .....	20
<b>6. CONCLUSIONS</b> .....	<b>23</b>
<b>7. PERSPECTIVES FUTURES</b> .....	<b>23</b>
<b>8. REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES</b> .....	<b>24</b>
<b>9. AGRAÏMENTS</b> .....	<b>28</b>
<b>10. ANNEXE: Abreviatures</b> .....	<b>28</b>



## RESUM/ABSTRACT

---

Actualment s'està estudiant molt la funcionalitat mitocondrial, i amb especial interès la seva relació amb l'obesitat. Aquest fet s'està estudiant en molts teixits, però el teixit aòrtic es coneix menys. Per aquest motiu, es realitza un treball experimental sobre la relació obesitat i biogènesi mitocondrial en el teixit aòrtic. S'utilitzen dos grups experimentals de rates mascle Wistar (n=6), el grup control i l'obès; alimentats amb una dieta baixa i rica en greix, respectivament, durant 26 setmanes. Seguidament, es calculen els nivells d'alguns marcadors de biogènesi mitocondrial en ambdós grups experimentals, les proteïnes PGC1 $\alpha$ , TFAM i COX IV, per determinar l'efecte de l'obesitat. Els resultats indiquen que no hi ha diferències significatives als marcadors de biogènesi mitocondrial estudiats entre els grups control i obès, tot i que s'intueix una lleugera disminució en els nivells de TFAM i PGC1 $\alpha$ , especialment del PGC1 $\alpha$ .

The mitochondrial functionality it's an important object of study these days, specially his relationship with obesity. Although the research that has been done in a lot of tissues, it is hardly known its development in aortic tissue. For this reason, an experimental work has been done to establish the association between obesity and mitochondrial biogenesis in the aortic tissue. To that purpose, it has been used two experimental Wistar male rats groups (n=6) (a control and obese group), fed with low and high fat diets respectively during 26 weeks. Afterwards it has been determined the level of some mitochondrial biogenesis markers (PGC1 $\alpha$ , TFAM and COX IV) of these two groups in order to detect obesity's effect in the process. The results show no significant differences between both groups regarding these mitochondrial biogenesis markers, in spite of it can be observed a slightly decreased levels of TFAM and PGC1 $\alpha$ , specially in the PGC1 $\alpha$  levels.



# INTRODUCCIÓ

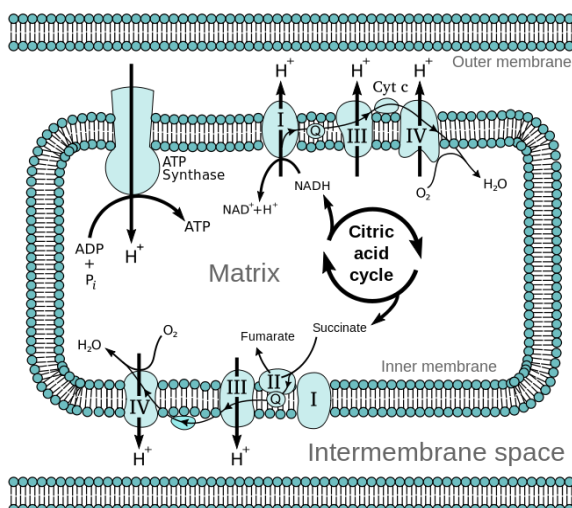
## 1. EL MITOCONDRI

El mitocondri és un orgànul intracel·lular present en quasi totes les cèl·lules, amb l'excepció d'algunes com els glòbuls vermells. Presenta una estructura particular, amb una membrana externa i una interna, i dos compartiments; l'espai intermembrana i la matriu mitocondrial on trobem l'ADN i els ribosomes mitocondrials (Gamero i Gamero, 2012; Eiris et al., 2008).

### 1. Funció

La principal funció dels mitocondris és la generació d'energia en forma d'ATP. Però a més estan implicats en múltiples funcions, participen en gran quantitats de processos metabòlics, ja siguin anabòlics o catabòlics, indispensables pel correcte funcionament cel·lular. Alguns exemples són la participació en la inducció de l'apoptosi, en la síntesis d'esteroides o altres biomolècules o en el manteniment de l'homeòstasi del calci (Montoya, 2005; Eiris et al., 2008; Gamero i Gamero, 2012).

Generar energia s'aconsegueix gràcies al correcte funcionament del sistema OXPHOS (la fosforilació oxidativa) del mitocondri, on s'utilitzen els equivalents reductors NADH i  $\text{FADH}_2$  obtinguts de l'oxidació dels nutrients per obtenir ATP. Aquest sistema està format per la cadena respiratòria mitocondrial (CRM) (o cadena transportadora d'electrons), que en eucariotes està formada per 5 complexos proteics localitzats a la membrana interna mitocondrial. També es necessiten dues molècules més en el procés, el coenzim Q i el citocrom c, a més d'altres enzims. A través d'aquesta cadena es reoxiden el NADH i  $\text{FADH}_2$  amb un conjunt de reaccions d'oxido-reducció, a la vegada que es transporten electrons, fins arribar a una reacció final on es redueix l'oxigen a aigua. Durant el procés es generen protons, que són translocats, gràcies a l'energia produïda durant el procés, des de la matriu mitocondrial a l'espai intermembrana a través dels complexos I, III i IV, creant un gradient electroquímic de protons que es utilitza per l'ATP sintasa (complex V), que torna a entrar els protons a la matriu mitocondrial generant ATP (figura 1). Si es produeix un excés d'energia aquesta és alliberada en forma de calor, i per altre banda cal destacar que sempre hi ha una petita fracció d'electrons que poden reaccionar amb l'oxigen i donar espècies reactives d'oxigen (ROS) (Montoya, 2005; Eiris et al., 2008; Koene i Smeitink, 2009; Campos et al., 2013).



**Figura 1. Sistema OXPHOS mitocondrial.** El complex I (NADH-ubiquinona oxidoreductasa) oxida el NADH i transporta els electrons fins el coenzim Q (CoQ). El complex II (succinat deshidrogenasa) reoxida el  $\text{FADH}_2$  i transporta els electrons al CoQ. El complex III (ubiquinona-citocrom c oxidoreductasa) transporta els electrons des del CoQ al citocrom c (Cyt c). El complex IV (citocrom c oxidasa) transfereix els electrons des del Cyt c a l'oxigen per formar aigua. Amb el gradient electroquímic creat amb el pas de protons a l'espai intermembrana, el complex V (ATP sintasa) pot generar ATP tornant a entrar els protons a la matriu mitocondrial (Campos et al., 2013).

## 2. Genoma mitocondrial

El mitocondri presenta algunes característiques particulars, com per exemple que té un genoma propi. Tot i que s'ha de destacar que el genoma mitocondrial només codifica per algunes proteïnes de la CRM, i alguns ARNt i ARNr necessaris per la síntesis de les proteïnes que codifica. És per això que pel correcte funcionament mitocondrial a més de participar el genoma mitocondrial també ho ha de fer el nuclear (Montoya, 2005; Campos et al., 2013).

Així, és el genoma nuclear el que codifica per la majoria de les proteïnes mitocondrials, ja siguin proteïnes del sistema OXPHOS o bé proteïnes reguladores de processos mitocondrials com la biogènesi mitocondrial. Seguidament aquestes són traduïdes en el citoplasma per ser transportades a l'interior del mitocondri. Es realitza un transport molt específic, es transporten en estat desnaturalitzat a través de dos tipus de translocases, les TOM (*translocase of the outer membrane*) i TIM (*translocase of the inner membrane*), per poder travessar la doble membrana mitocondrial i així situar-se a la matriu mitocondrial. A continuació són renaturalitzades, processades i acoblades amb altres subunitats codificades pel genoma mitocondrial (Montoya, 2005; Campos et al., 2013; Ventura-Clapier et al., 2008).

El motiu de que tinguin un genoma propi és degut a l'origen dels mitocondris, l'endosimbiosi entre un proteobacteri i un ancestre d'una cèl·lula eucariota amb nucli; els dos amb el seu propi genoma. Però amb el temps s'haurien anat transferint els gens del proteobacteri al nucli, quedant uns pocs gens al mitocondri (Montoya, 2005).

Específicament el genoma mitocondrial es tracta d'una molècula d'ADN doble circular (cadena lleugera i pesada) covalentment tancada i superenrotllada localitzada a la matriu mitocondrial. En humans, està format per 16.569 parells de bases i codifica per 37 gens. D'aquests, 2 codifiquen per ARNr (12S i 16S), 22 per ARNt i 13 per polipèptids dels complexos del sistema OXPHOS: en concret codifiquen 7 dels 46 polipèptids del complex I, un dels 11 del complex III, 3 dels 13 del complex IV i 2 dels 16 de l'ATP sintasa (complex V). La resta de polipèptids que conformen els 5 complexos proteics de la CRM venen codificats pel genoma nuclear (Montoya, 2005; Campos et al., 2013; Rubio i Verdecia, 2004).

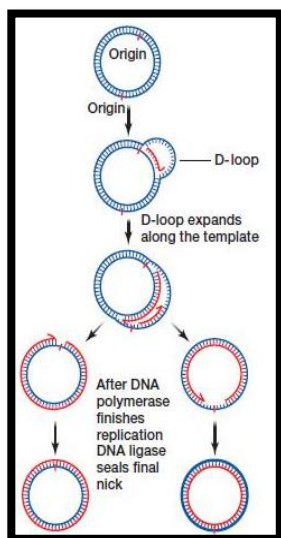
Per altre banda, el genoma mitocondrial té tot un conjunt de característiques que el diferencien del nuclear. Es tracta d'un genoma molt compacte i sense introns (només conté un 3% de seqüències no codificants), utilitza un codi genètic distint al nuclear (per exemple UGA codifica per triptòfan en lloc de ser un codó d'aturada) i presenta una taxa de mutació molt elevada (de 6 a 17 vegades superior a la nuclear) degut a la falta d'histones, la continua generació de ROS i una defensa antioxidant dèbil (Campos et al., 2013). També presenten poliplàsmia, cada cèl·lula conté un nombre variable d'ADNmit i de mitocondris ja que el repartiment dels mitocondris i de l'ADNmit durant la mitosis és a l'atzar (segregació replicativa). Però en general cada mitocondri conté més d'una molècula d'ADNmit (entre 2 i 10) agrupades en complexos anomenats nucleoides i cada cèl·lula conté centenars o milers de mitocondris (segons el tipus cel·lular). Finalment destacar que presenta una herència exclusivament materna, ja que els mitocondris paternals són degradats selectivament en les primeres etapes del desenvolupament embrionari (Montoya, 2005; Campos et al., 2013; Gamero i Gamero, 2012).

Una altre particularitat és la manera en que es replica i tradueix el genoma mitocondrial. Com s'ha dit l'ADN mitocondrial presenta dues cadenes circulars, la lleugera i la pesada, i cada una conté el seu origen de replicació ( $O_L$  i  $O_H$ ). Al estar molt separats i en distintes cadenes, la replicació

és unidireccional i asimètrica (model de desplaçament del loop-D) (figura 2). Així la replicació s'inicia formant un ARN encebador per part d'una ARN polimerasa utilitzant com a motlle el promotor de la cadena lleugera (es troba en el D-loop on també hi ha el  $O_H$ ). Aquest procés s'inicia quan s'uneix el TFAM al dúplex d'ADN, ja que al ser un membre de les proteïnes HMG (*high mobility group*), el desenrotlla permetent l'entrada de l'ARN polimerasa. Es va elongant unidireccionalment la cadena pesada naixent mitjançant l'ADN polimerasa gamma i l'encebador s'escindeix mitjançant una endonucleasa (RNasa MRP). Quan la cadena naixent arriba a l'altre origen de replicació ( $O_L$ ), es comença a replicar una nova cadena lleugera a partir de la pesada que s'ha anat desplaçant (també s'utilitza un ARN iniciador) (Montoya, 2005; Koene i Smeitink, 2009; Hyde, 2013; Benito, 2013).

En la transcripció actua una ARN polimerasa (mtRNAPol o POLRMT) i distints factors de

transcripció codificats pel nucli, TFB1M i TFB2M, TFAM i mTERF, necessaris pel reconeixement del promotor, l'activació i la terminació respectivament (Scarpulla, 2008). Cal tornar a destacar el TFAM, que desenrotlla l'ADN facilitant la unió de la resta de factors necessaris. Però TFAM té major afinitat pel promotor de la cadena lleugera que de la pesada, per tant amb nivells baixos de TFAM s'activa l'expressió dels productes de la cadena lleugera (8 ARNt i una subunitat del complex I), però no els de la pesada (2 ARNr, 14 ARNt i proteïnes mitocondrials). Això és perquè el promotor de la cadena lleugera a més d'activar l'expressió d'aquests productes, també potencia la formació de molècules d'ARN que donaran els encebadors necessaris per la replicació. Per tant veiem que la replicació i transcripció estan molt lligades, la transcripció és necessària per iniciar la replicació. Es necessiten baixos nivells de TFAM per dur a terme la replicació i uns nivells superiors perquè hi hagi la transcripció (Maniura-Weber et al., 2004; Koene i Smeitink, 2009).



**Figura 2. Replicació de l'ADN mitocondrial: model de desplaçament del D-loop** (Hyde, 2013)

### 3. Biogènesi mitocondrial i la seva regulació

La biogènesi mitocondrial és un procés molt complex, que inclou dos processos coordinats, que són la proliferació mitocondrial, és a dir l'augment del nombre de mitocondris per cèl·lula (a partir de mitocondris mare es generen nous mitocondris) i la diferenciació mitocondrial, és a dir l'augment de la funcionalitat dels mitocondris existents, que, van adquirint noves propietats mitjançant l'adquisició de proteïnes. En funció del tipus cel·lular aquesta diferenciació és distinta, així els mitocondris de diferents teixits poden tenir una estructura i una capacitat de proliferació un poc distinta, tot i que la funció és la mateixa. Destacar que la proliferació i diferenciació es poden donar de manera separada o conjunta, en funció de les necessitats del teixit (Nadal-Casellas et al, 2013; Gomez-Perez et al., 2012).

Com ja s'ha mencionat en l'apartat anterior és fonamental la coordinació entre el genoma mitocondrial i el nuclear per les funcions mitocondrials, com el funcionament del sistema OXPHOS, però també ho és per la regulació de la biogènesi mitocondrial (Montoya, 2005). De fet en la biogènesi mitocondrial participen uns mil gens, però d'aquests, només un 5% estan codificats pel genoma mitocondrial, la resta venen codificats pel nuclear (Stojanovski et al., 2003).

Hi ha distints models que expliquen la biogènesi mitocondrial, però el més acceptat és el basat en que la PGC1 $\alpha$  (*peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 $\alpha$* ) actua

com a connector entre els estímuls externs (la demanda energètica) i els canvis en la biogènesi mitocondrial. Així, PGC1 $\alpha$  és el principal regulador de la biogènesi mitocondrial (Puigserver i Spiegelman, 2003), té la capacitat d'unir-se i activar a múltiples factors de transcripció en el nucli en resposta a les necessitats energètiques, com per exemple als factors de respiració nuclear (NRFs: *nuclear respiratory factors*) (Wu et al., 1999). Els NRFs són factors de transcripció que regulen l'expressió de la majoria dels gens nuclears implicats en la biogènesi mitocondrial, com per exemple el factor de transcripció mitocondrial A (TFAM: *mitochondrial transcription factor A*), el TFB1M i el TFB2M, però també regulen la funció respiratòria mitocondrial al regular l'expressió de nombroses subunitats de la CRM. El TFAM és un factor de transcripció mitocondrial fonamental codificat pel genoma nuclear, implicat en la replicació i transcripció de l'ADN mitocondrial (com s'ha destacat en l'apartat anterior)(Maniura-Weber et al., 2004), concretament interacciona amb els promotors de les dues cadenes de l'ADNmit i així es pot reclutar a TFBM (*transcription factor B*) unit a l'ARN polimerasa, activant l'expressió dels gens mitocondrials (Ventura-Clapier et al., 2008).

Resumint, en resposta a la demanda energètica, PGC1 $\alpha$  activa els NRFs en el nucli, que activaran la transcripció de gens nuclears codificants de proteïnes mitocondrials, com és el cas del TFAM. Aquest serà sintetitzat en el citoplasma de la cèl·lula per a continuació ser transportat al mitocondri, on activa l'expressió i replicació del genoma mitocondrial. Així el TFAM és el connector entre el genoma nuclear i mitocondrial.

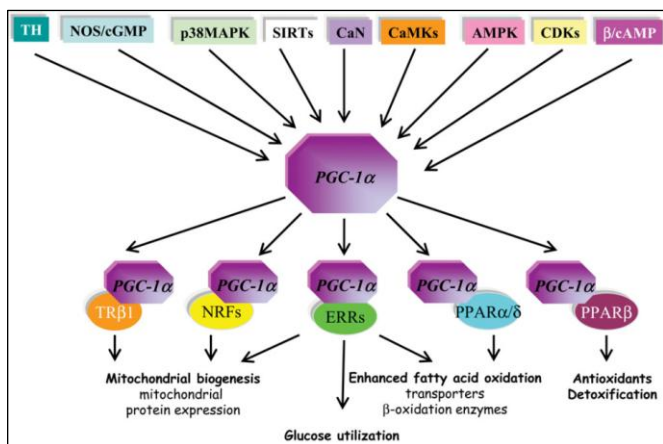
Tot i que el PGC1 $\alpha$  es considera el principal regulador de la biogènesi mitocondrial, s'han descrit altres coactivadors que podrien actuar amb combinació amb el PGC1 $\alpha$ , aquest són el PGC1 $\beta$  i el PRC (coactivador relacionat amb PGC) (Andersson i Scarpulla, 2001; Lin et al., 2002; Scarpulla, 2002). Però sembla que només PGC1 $\alpha$  respon a canvis metabòlics, suggerint que PGC1 $\beta$  estaria més implicada en la biogènesi mitocondrial constitutiva (Ventura-Clapier et al., 2008).

El PGC1 $\alpha$  no té la capacitat d'unir-se directament a l'ADN per regular-lo, però si que pot interaccionar i coactivar molts factors de transcripció, com per exemple els NRFs i el TFAM. Però a més pot coactivar els PPARs, les hormones tiroides, glucocorticoides, estrògens o els receptors associats a estrògens ERR $\alpha$  i  $\gamma$ . Així s'ha vist que en la biogènesi mitocondrial, de fet, actua un complex conjunt de factors de transcripció (NRFs/PPARs/ERRs) que activen gens diana que codifiquen per enzims FAO (*fatty acid transport and oxidation*), fosforilació oxidativa i defenses antioxidants. I PGC1 $\alpha$  controla l'expressió de tota aquesta xarxa de factors de transcripció (**figura 3**) (Ventura-Clapier et al., 2008; Scarpulla et al., 2012).

La regulació de la biogènesi mitocondrial és a molts nivells, per exemple regulació de l'expressió del genoma mitocondrial o regulació del transport al mitocondri de proteïnes codificades pel genoma nuclear (Justo, 2006). Tot i així encara no es té clara la regulació de la biogènesi mitocondrial en distintes situacions fisiològiques. Es sap que el PGC1 $\alpha$  és regulat en resposta a gran quantitat de vies de senyalització implicades en el metabolisme energètic, creixement cel·lular i la diferenciació, com s'observa en la **figura 3** (Scarpulla et al., 2012). Destaca la implicació de les sirtuïnes, una família de proteïnes (de moment se n'han identificat 7), (Schwer i Verdin, 2008) i la via del AMPK, que activen la PGC1 $\alpha$  (Gomez-Perez et al., 2012). També s'ha vist una regulació a nivell de modificacions post-traduccionals, per exemple la SIRT1 (deacetilasa depenent de NAD<sup>+</sup>) actuaria desacetilant múltiples residus de lisina de la PGC1 $\alpha$ , o bé les proteïnes quinasa activades per AMP (AMPK), enzim que és activat en resposta a l'esgotament energètic del múscul, que actuaria fosforilant residus de serina i treonina de la PGC1 $\alpha$  (Scarpulla, 2011; O'Neill et al., 2013).



Així aquest complex control de la biogènesi mitocondrial permet l'adaptació de la massa i funcionalitat mitocondrial segons les demandes cel·lulars (Jones et al., 2012). Per exemple s'ha vist que la biogènesi mitocondrial s'activa en resposta a una major demanda energètica per part de la cèl·lula, com per exemple ocorre durant l'exercici físic intens, l'exposició al fred, la restricció calòrica o l'estrès oxidatiu (Ventura-Clapier et al., 2008). També hi ha diversos estudis que han demostrat que l'administració d'una dieta hiperlipídica inductora de l'obesitat afecta a la biogènesi mitocondrial de diferents teixits de rata, com el TAM (Nadal-Casellas et al., 2013), múscul esquelètic (Gomez-Perez et al., 2012) o fetge (Nadal-Casellas et al., 2010). No obstant això, en el teixit aòrtic no hi ha estudis que demostrin encara canvis en els paràmetres de biogènesi mitocondrial induït per l'obesitat.



**Figura 3. Regulació i acció de la PGC1α.** S'ha vist que la PGC1α està regulada per gran quantitat de vies, com les que s'observen en la part superior de la imatge: les hormones tiroides (TH), l'òxid nítric sintasa (NOS/cGMP), proteïna quinasa activada per p38 (p38MAPK), sirtuïnes (SIRT1), calcineurina (CaN), quinasa activada per Ca<sup>2+</sup>/calmodulina (CaMKs), quinasa activada per monofosfat d'adenosina (AMPK), quinases dependents de ciclina (CDKs) i estimulació beta adrenèrgica (β/cAMP). Per altre banda, a la part inferior, es veuen alguns dels factors de transcripció que coactiva PGC1α: factors respiratoris nuclears (NRFs), receptors relacionats amb estrògens (ERRs) i receptors activats per proliferadors de peroxisomes (PPARs), que regulen distintes aspectes com la biogènesi mitocondrial, oxidació d'àcids grassos i defensa antioxidant. (Ventura-Clapier et al., 2008)

## 2. OBESITAT I MALALTIA CARDIOVASCULAR

### 1. Dieta hiperlipídica i disfunció mitocondrial

L'obesitat és una acumulació excessiva de greix, resultat d'un desequilibri entre la ingesta i la despesa energètica (Hernández, 2007). Aquesta patologia, cada vegada és més freqüent, tant en països desenvolupats com en vies de desenvolupament, a causa d'un excessiu consum de dietes riques en colesterol, greixos i calories, juntament amb la manca d'exercici (Lu et al., 2013).

S'ha comprovat que l'alimentació amb una HFD (*high fat diet*) pot conduir a un estat d'obesitat, ja que produeix un increment en la captació i oxidació dels àcids grassos, i l'excés energètic s'acumula en forma de reserves grasses. A més l'acumulació excessiva de triglicèrids (TG) en el teixit adipós sovint activa les vies inflamàtores i indueix l'expressió de citocines proinflamàtores, com ara el factor de necrosi tumoral α (TNF-α), interleucina-6 (IL-6) i proteïna quimiotàctica de monòcits-1 (MCP-1), que poden jugar un paper central en el desenvolupament de l'obesitat i la resistència a la insulina (RI) (Antuna-Puente et al., 2008). D'aquesta manera l'obesitat està associada a un estat pro-inflamatori, però també a un estat pro-oxidant (estrès oxidatiu), resultat d'un desequilibri entre la producció de ROS i de les defenses antioxidants. Això és perquè l'obesitat incrementa el nombre de substrats disponibles per l'oxidació i el flux d'electrons que es transporten per la CRM, provocant finalment major producció de radicals lliures. I per altre banda també s'ha demostrat que amb l'obesitat es produeix una disminució de les principals defenses antioxidants, ja siguin enzims antioxidants com el superòxid dismutasa, glutatió peroxidasa o glutatió reductasa, o defenses no enzimàtiques com el glutatió. Per tant, aquests dos fets sumats condueixen a la disfunció mitocondrial, ja que la balança entre les ROS i les defenses antioxidants es decanta cap

a les ROS, i aquestes poden causar dany als mitocondris (i també a la cèl·lula en general) mitjançant la peroxidació dels lípids, la modificació de les proteïnes i la mutació de l'ADN (Nadal-Casellas et al., 2010). A la vegada l'estrès oxidatiu s'ha proposat com a nexa d'unió entre l'obesitat i la RI (Scarpulla et al., 2012).

Per tant l'obesitat va associada a una gran quantitat d'alteracions metabòliques, totes tenen en comú la disfunció mitocondrial i la RI, que poden donar patologies molt freqüents com la diabetis miellitus tipus 2 (DM2) o malalties cardiovasculars. (Nadal-Casellas et al., 2010; Scarpulla et al., 2012). La RI i la disfunció mitocondrial estan molt relacionades, s'ha vist que per la correcta inducció de la secreció de insulina per acció de la glucosa es fonamental el correcte funcionament mitocondrial (Nadal-Casellas et al., 2013). Això és perquè el metabolisme glucídic (i també el lípidic) finalitzen en el mitocondri, per generar energia en forma d'ATP. Com ja s'ha dit, amb una HFD, hi ha un augment dels substrats disponibles per ser oxidats, produint un augment del funcionament de la CRM, per tant es produeixen més ROS i també metabòlits derivats dels àcids grassos (diacilglicerol i acil-CoA). Aquests poden alterar la via de senyalització de la insulina. Així la disfunció mitocondrial és clau en el desenvolupament de la resistència a la insulina, i aquesta en l'obesitat, ja que s'ha vist que la resistència a la insulina és una característica primerenca i primordial associada a l'obesitat (Kahn i Flier, 2000).

En resum, l'obesitat condueix a la disfunció mitocondrial, i aquesta a un increment dels àcids grassos intracel·lulars i de les ROS, així es pot veure alterada la via de senyalització de la insulina, com s'ha observat en humans i en estudis de rosegadors (Victor et al., 2011; Samuel et al., 2004; Beyer et al., 2008). Però com s'ha vist en l'estudi de Nadal-Casellas et al., 2013 sobre l'efecte d'una HFD en el teixit adipós marró (TAM), l'estimulació de la diferenciació mitocondrial pot pal·liar aquests efectes nocius. Així les rates mascles obesas d'aquest estudi presentaven un augment de la diferenciació mitocondrial, d'aquesta manera podien fer front a l'augment dels substrats disponibles per oxidar i així no s'esdevenia l'acumulació d'àcids grassos ni l'estrès oxidatiu. En canvi en les femelles obesas, la diferenciació mitocondrial va disminuir, així, tot i que va augmentar la proliferació mitocondrial, presentaven dany oxidatiu i una via de senyalització de la insulina alterada, a més d'un major pes corporal al no poder fer front al gran augment de substrats disponibles. Però s'ha de remarcar que tot i que les femelles presenten un major pes corporal, l'acumulació de lípids en el teixit a estudiar (per exemple en fetge a Nadal-Casellas et al., 2010 o múscul esquelètic a Gómez-Pérez et al., 2012) és menor, ja que com s'observa amb l'índex d'adipositat (superior que als mascles), principalment s'acumulen al teixit adipós. Això és degut a que les femelles tenen una major capacitat d'emmagatzemar energia en el teixit adipós per protegir als altres teixits de la lipotoxicitat que podria afectar la funcionalitat d'aquests (Virtue i Vidal-Puig, 2010). Així, les femelles de mamífers poden haver desenvolupat mecanismes per gestionar més eficientment els recursos energètics com a estratègia evolutiva d'acord a la seva funció reproductiva, per permetre la seva supervivència i la de la seva progènie (Hoyenga i Hoyenga, 1982).

Tot i així, en altres teixits els resultats són distints. Per exemple en el múscul esquelètic (Gómez-Pérez et al., 2012) s'ha vist que la HFD indueix la biogènesi mitocondrial tant a mascles com a femelles, tot i que sembla que aquest augment es veu més marcat en mascles per tal de compensar un major dany oxidatiu en aquests. Per altre banda, en el fetge, en els dos sexes es produeix una proliferació mitocondrial per contrarestar el deteriorament de la funció mitocondrial induïda per la dieta, però es veu una disminució de la diferenciació mitocondrial, tot i que en les femelles la

diferenciació mitocondrial és major que en els mascles. Així aquests resultats es poden explicar amb els nivells de TFAM, aquests són superiors en el control en comparació al grup HFD, però també són més elevats en femelles en comparació als mascles. Això explica que amb la HFD disminueixi la diferenciació mitocondrial i que en les femelles sigui superior. Ja que el TFAM és un factor transcripcional clau en l'expressió de l'ADNmt, i com ja s'ha comentat, només pot haver transcripció (expressió) de l'ADNmt, i per tant diferenciació, a concentracions elevades de TFAM (Falkenberg et al., 2002; Garstka et al., 2003; Maniura-Weber et al., 2004).

El que sembla clar, és que la biogènesi mitocondrial actuaria com a mecanisme adaptador del deteriorament mitocondrial provocat per l'estrès oxidatiu i l'acumulació de lípids tòxics, que aquests, a la vegada, són conseqüència de l'augment dels substrats disponibles provinents de la ingesta d'una HFD (Gómez-Pérez et al., 2012). Així, la diferenciació mitocondrial actua per millorar l'eficàcia de la CRM.

Tot i això sembla que hi ha resultats oposats en quant l'efecte d'una dieta inductora d'estrès oxidatiu sobre la funció mitocondrial, ja que alguns estudis afirmen que la HFD millora la capacitat mitocondrial oxidativa (diferenciació mitocondrial)(Turner et al., 2007), mentre que altres obtenen resultats contraris (Valerio et al., 2006; Sparks et al., 2005). Les raons d'aquests resultats oposats no es coneixen bé actualment.

Per tot això, és té molt interès en estudiar les vies de regulació de la funció i biogènesi mitocondrial, i així trobar noves dianes terapèutiques per aquestes patologies associades a l'obesitat (Scarpulla et al., 2012). Com hem vist les vies implicades en l'activació de la PGC1 $\alpha$  són moltes (figura 3), doncs algunes d'aquestes s'activarien durant l'obesitat estimulant així la biogènesi mitocondrial. Per exemple s'ha vist que amb l'obesitat es produeixen canvis en els nivells ATP/ADP que activen la via de la AMPK, i aquesta activa la biogènesi mitocondrial.

## *2. Malalties cardiovasculars i disfunció endotelial*

Els mitocondris són fonamentals pel correcte funcionament del cor, ja que aquest necessita energia en tot moment, té una activitat oxidativa molt elevada. Així, s'ha vist que la disfunció de la CRM pot conduir a la disfunció endotelial, que a la llarga finalitza amb malalties cardiovasculars (Casademont i Miro, 2002).

Així, la teoria de la disfunció mitocondrial postula que l'excés de ROS dels mitocondris (ja que la CRM és la principal productora de ROS) és responsable de la reacció vascular inflamatòria que condueix a malalties cardiovasculars (Ballinger, 2005; Puddu et al., 2005). S'ha vist que molts factors de risc vascular, com la hiperglucèmia, la RI, la hipercolesterolèmia o l'oxidació de les LDL, poden afectar negativament a la funció mitocondrial de les cèl·lules endotelials produint un increment de les ROS, aquests contribuiran a la disfunció endotelial i finalment en el desenvolupament de malalties cardiovasculars. A més, l'excés de ROS afecta a les membranes, proteïnes i ADN mitocondrial, agreujant la disfunció mitocondrial, el que fa que es produeixin més ROS i per tant es creï un cicle viciós (Ballinger et al., 2002).

Per tant, vèiem que la generació de ROS, que condueix a un augment del dany oxidatiu, és el factor clau en el desenvolupament de les malalties cardiovasculars (Dhalla et al., 2000). Així s'ha vist que la disfunció endotelial es caracteritza per una disminució de la biodisponibilitat d'òxid nítric i el desenvolupament d'un fenotip inflamatori (Tabit et al., 2010), característiques que es donen quan augmenta la producció de ROS, per això l'estrès oxidatiu és el mecanisme clau en el

desenvolupament de la disfunció endotelial (Cohen i Tong, 2010). Aquest excés de producció potser degut a diversos factors, com per exemple l'obesitat (Caballero, 2003 i Tripathy et al., 2003), de fet, tot i que encara no es coneix bé el mecanisme de disfunció endotelial, s'ha vist una associació dieta rica en greixos-disfunció endotelial (Symons et al., 2009, Zhang et al., 2012).

És interessant destacar que s'han vist diferències entre gènere en quant a la producció de ROS, sent les femelles les que en produeixen menys (Borras et al., 2003), així les femelles tenen protecció davant el risc de malalties cardiovasculars. Això s'ha observat en l'estudi de Colom et al., 2007b, les femelles presenten major diferenciació mitocondrial i menor producció de ROS, així tenen menys dany oxidatiu. Concretament s'ha vist que aquest menor dany oxidatiu és conseqüència d'una menor producció de ROS i no pas per una major capacitat antioxidant (Colom et al., 2007b), ja que al presentar major diferenciació mitocondrial, la CRM és més eficaç i per tant es produeixen menys ROS (Boveris i Chance, 1973). S'ha postulat que aquest dimorfisme sexual és degut a les hormones sexuals femenines, ja que en femelles castrades augmenta el dany oxidatiu en comparació a les no castrades (Barp et al., 2002).

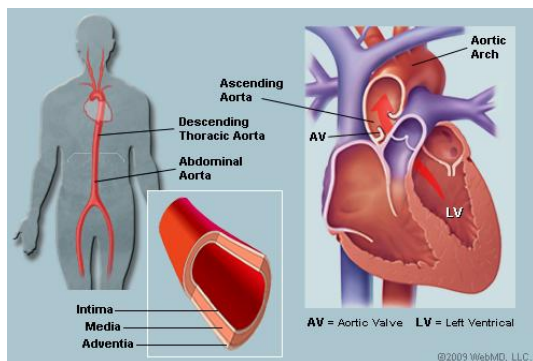
Tot i així, s'ha demostrat que les ROS no només tenen aquest paper negatiu actuant com a productes tòxics derivats de la respiració cel·lular, sinó que també participen com a molècules senyal en les cèl·lules endotelials (Cai et al., 2002; Felty et al., 2005; Kimura et al., 2005; Miura et al., 2003; Waypa et al., 2003), així per exemple, actuen en la regulació del to vascular, del creixement cel·lular i proliferació, en l'apoptosi i en les respostes inflammatòries. Però si es produeix un excés d'aquests ROS, es condueix a la interrupció de la via de senyalització de les ROS i a la disfunció mitocondrial, contribuint a les malalties cardiovasculars (Zhang i Gutterman, 2007), com per exemple l'aterosclerosi. Aquesta és una patologia crònica caracteritzada per la formació d'una placa d'ateroma en la capa íntima de les artèries, com a resposta al dany endotelial.

S'ha vist que la desregulació de la biogènesi mitocondrial és una de les manifestacions primerenques de la disfunció endotelial (Addabbo et al., 2009), per tant, la identificació dels mecanismes d'activació de la biogènesi mitocondrial en les cèl·lules endotelials pot contribuir a desenvolupar nous fàrmacs per a malalties vasculars. En aquest sentit, s'ha vist que en cèl·lules endotelials, l'administració de concentracions fisiològics rellevants de resveratrol (Baur i Sinclair, 2006) estimula la SIRT1, i aquesta indueix la biogènesi mitocondrial (Czisar et al., 2009). Per altre banda, també s'ha vist que la PGC1 $\alpha$  juga un paper clau en la protecció de l'endoteli, regula transcripcionalment el sistema de defensa antioxidant mitocondrial, augmentant la capacitat mitocondrial de detoxificació de les ROS, prevenint la disfunció endotelial o l'apoptosi en condicions d'estrès oxidatiu, com és l'obesitat (Valle et al., 2005). D'aquesta manera tant el resveratrol com el PGC1 $\alpha$  són potencials fàrmacs per a malalties cardiovasculars o associades.

### *3. Característiques i metabolisme de l'aorta*

L'aorta és l'arteria més gran del cos humà, i el seu diàmetre varia en funció de l'edat o sexe (Holloway et al., 2011). Concretament es pot dividir en 3 fragments: un primer fragment anomenat aorta ascendent; que va des del ventricle esquerre del cor fins l'arc aòrtic, aquest és el següent fragment i té forma corba, i el tercer fragment és l'aorta descendent; que a la vegada es divideix en dos trams: l'arteria descendent toràcica (localitzat des de l'arc aòrtic fins al diafragma) i l'arteria descendent abdominal (des del final del diafragma fins a la bifurcació de l'aorta) (Holloway et al.,

2011). Finalment a l'altura de la vèrtebra IV lumbar l'aorta es divideix en dues artèries més petites, les artèries ilíaqües comuns (figura 4) (Gray, 1918).



**Figura 4. Seccions de l'aorta:** aorta ascendent i arc aòrtic (imatge de la dreta), aorta descendent toràcica i aorta descendent abdominal (imatge de l'esquerra). També es representen les tres capes que conformen la paret vascular de l'aorta: túnica íntima, mitjana i adventícia (imatge central). Imatge de WebMD, 2009.

La principal funció de l'aorta, com totes les artèries, és transportar i distribuir sang oxigenada, però en aquest cas és una artèria tan gran que proporciona sang oxigenada a totes les artèries del sistema circulatori (a excepció de les artèries pulmonars, que neixen del ventricle dret del cor). És a dir que abasteix a tot el cos excepte la zona respiratòria dels pulmons. Així l'aorta ascendent irriga al cor, l'arc aòrtic al cap, coll i braços, l'aorta descendent a tot el tòrax (a excepció del cor i zona respiratòria pulmonar) i l'aorta descendent abdominal a l'abdomen. Finalment són les artèries ilíaqües comuns que irriguen la pelvis i les extremitats inferiors.

S'ha de remarcar que el teixit aòrtic metabòlicament està molt poc estudiat, però per altre banda s'utilitza molt en estudis de la funció/disfunció endotelial. També és interessant destacar que l'estructura del sistema circulatori de la rata és pràcticament idèntic a la dels humans (Sowash, 2009). Per aquest motiu en el present treball experimental s'ha utilitzat la rata com a model animal.

## OBJECTIUS I PLANTEJAMENT EXPERIMENTAL

L'objectiu del present treball experimental és determinar si l'alimentació amb una dieta hiperlipídica (HFD) produeix canvis en els paràmetres marcadors de la biogènesi mitocondrial a nivell del teixit aòrtic. Per tant, indirectament, conèixer si la funció endotelial es pot veure afectada.

Per tal d'assolir aquest objectiu s'ha optat per determinar els nivells d'algunes proteïnes marcadors de la biogènesi i funcionalitat mitocondrial, com són TFAM, PGC1 $\alpha$  i COX IV.

Específicament, com a model animal s'han utilitzat rates mascle Wistar. Aquestes s'han dividit en dos grups experimentals, un grup control (C), alimentat amb una dieta baixa en greixos i un grup de rates alimentades amb una dieta rica en greixos (HFD). S'ha de remarcar que aquest treball experimental es basa en la utilització de mostres de teixit aòrtic que es van recollir i congelar a  $-80^{\circ}\text{C}$  en un experiment desenvolupat prèviament.

El teixit escollit per fer les determinacions dels marcadors de biogènesi mitocondrial és el de l'aorta, un vas sanguini molt utilitzat als experiments centrats en estudis de funció endotelial. Cal indicar que pràcticament no hi ha estudis sobre l'efecte de l'obesitat sobre la biogènesi mitocondrial en aquest teixit.

El plantejament experimental inicial anava encaminat a determinar els nivells d'ARNm dels marcadors de biogènesi mitocondrial Sirt1, TFAM i PGC1 $\alpha$ , però va ser modificat al llarg del seu desenvolupament i, finalment, es van quantificar els nivells de les proteïnes TFAM, PGC1 $\alpha$  i COX IV per Western-blot.

## MATERIALS I MÈTODES

---

### 1. Materials i reactius

El reactiu d'aïllament de proteïnes i àcids nucleics, TriPure<sup>®</sup> (*Tripure isolation reagent*), va ser adquirit a Roche Diagnostics (Basel, Switzerland).

*Anticossos primaris.* Anti-COX IV (nombre de catàleg: MS407) va ser proporcionat per MitoScience (Eugene, OR, USA). Anti-Actina (C-2) (nombre de catàleg: sc-8432), anti-PGC1 $\alpha$  (H300) (nombre de catàleg: sc-13067) i anti-TFAM (mtTFA) (A-16) (nombre de catàleg: sc-30962), els tres adquirits de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA).

*Anticossos secundaris.* Estan conjugats amb peroxidasa de rave (HRP), i en funció de l'hoste de l'anticòs primari s'utilitza un secundari o un altre: de *rabbit* per PGC1 $\alpha$  (Cell Signalling Technology (Danvers, MA, USA), nombre del producte: 2037). De *goat* per TFAM (Sigma-Aldrich, nombre del producte: C2821). I de *mouse* per COX IV i actina (Sigma-Aldrich, nombre del producte: A9044).

El marcador utilitzat per determinar el pes molecular de les proteïnes va ser el *Precision Plus Protein™ Dual Color Standards* de Bio-Rad (nombre de catàleg: 161-0374).

Els reactius pel revelat de quimioluminescència van ser proporcionats per Bio-Rad (Hercules, CA, USA).

Tots els productes químics rutinaris van ser adquirits de Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) i de Panreac (Barcelona, Espanya).

El pinso pel grup experimental de dieta control (A04) va ser obtingut de Panlab (Barcelona, Espanya).

### 2. Animals i grups experimentals

Primer de tot destacar que els experiments amb animals es van realitzar respectant les directrius generals del Reglament Europeu (86/609/CEE i 2003/65/CE) i de la Comissió de Bioètica de la UIB (COBE).

Per la realització d'aquesta investigació es van utilitzar 12 rates Wistar mascle de 10 setmanes d'edat, amb un pes corporal mitjà de  $332 \pm 4$  g. Aquestes van ser adquirides a Charles River (Barcelona, Espanya). Els animals es van mantenir durant 26 setmanes en gàbies (2 rates per gàbia) en condicions ambientals controlades, amb una temperatura constant de 22°C i cicles de 12 h de llum/obscuritat (de 8.00h a 20.00 h període de llum i la resta d'obscuritat). També tenien accés *ad libitum* al menjar i a l'aigua.

Els animals es varen dividir en dos grups experimentals, un grup control (n=6) alimentats amb pinso estàndard, baix en greix (2,9% de greix), i un grup HFD (n=6) amb una dieta rica en greixos (26%





de greix) anomenada dieta de cafeteria, que està composta per galetes, paté de fetge de porc, cansalada fresca, xocolata i ensaïmada. Aquest tipus de dieta és més eficaç en la inducció d'obesitat en les rates que no pas l'administració de pinso ric en greix, degut a la seva palatabilitat induint, per tant, una hiperfàgia voluntària. A més, aquesta dieta imita molt bé el desenvolupament de l'obesitat que es dona als humans (Sclafani i Springer, 1976). La durada del tractament dietètic va ser de 26 setmanes.

De manera més detallada, la composició energètica de les dues dietes utilitzades es representa a la **taula 1**. Altres detalls de la composició de les dietes i característiques de les rates es detallen en les següents publicacions: Gomez-Perez et al., 2012; Nadal-Casellas et al., 2010; Nadal-Casellas et al., 2011; Nadal-Casellas et al., 2013.

**Taula 1. Composició energètica de les dietes control i HFD** (Adaptació de Gomez-Perez et al., 2012)

	Dieta control	Dieta rica en greixos
<b>% de proteïnes</b>	19 %	13 %
<b>% de carbohidrats</b>	73 %	33 %
<b>% de lípids</b>	8 %	54 %
<b>Contingut energètic total (% de greix)</b>	3,385 Kcal/Kg (2,9 %)	3.876 Kcal/Kg (26 %)

Al llarg de les 26 setmanes, en que es van mantenir els grups experimentals amb les condicions esmentades anteriorment, es van mesurar els pesos corporals d'aquests cada mes. En l'apartat de resultats, en la **taula 3**, es remarquen els pesos finals i el guany de pes.

Per altre banda, una setmana abans del sacrifici es va mesurar la ingesta energètica i la ingesta concreta de cada aliment de la dieta rica en greixos. Per mesurar-ho es van introduir les rates en caixes metabòliques individuals (proporcionades per Panlab, Barcelona) durant 24 hores. Per calcular la ingesta de cada aliment de la HFD se lis van donar els aliments en porcions petites i en excés, al dia següent es van recuperar les porcions no ingerides, així la diferència entre el menjar ofert menys el recuperat ens informa de la ingesta concreta de cada animal. Aquests resultats es poden consultar en les **taules 3 i 4** de l'apartat de resultats.

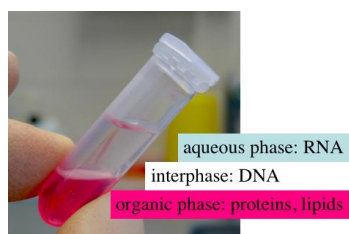
Finalment remarcar que per tal d'evitar variacions degudes a la ingesta d'aliments, es van deixar les rates en dejú durant 12 hores abans de ser sacrificades per decapitació. Inmediatament es van recollir les aortes, la resta de teixits i mostres de sèrum, i es van pesar tots els teixits recollits. Totes les mostres van ser congelades amb nitrogen líquid i es van emmagatzemar a  $-80^{\circ}\text{C}$  fins el moment del seu processament i anàlisi.

### 3. Processament de les mostres

Inicialment, es va plantejar la determinació dels nivells d'ARNm dels principals marcadors de biogènesi mitocondrial. Per aquest motiu es va aïllar l'ARN cel·lular total de les mostres d'aorta (grup control i grup HFD) utilitzant el reactiu TriPure® (*TriPure Isolation Reagent*®), seguint el protocol establert pel fabricant (Roche Diagnostics GmbH – Roche Applied Science, Mannheim, Alemanya).

El reactiu TriPure® es tracta d'una dissolució monofàsica de tiocianat de guanidina i fenol, que serveix per l'aïllament d'ARN, però també per l'aïllament d'ADN i proteïnes. Així, a més d'aïllar l'ARN de les mostres d'aorta, també es va aïllar l'ADN i les proteïnes.

D'aquesta manera es va pesar entre 50 i 100 mg d'aorta, que es va homogeneïtzar amb 1 mL del reactiu TriPure® amb un instrument de dispersió, específicament el model T10 basic Ultra-Turrax® (IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Alemanya). Aquest reactiu romp les cèl·lules i desnatura les nucleases endògenes, de manera que l'ADN i l'ARN de les mostres es conserva. Seguidament al afegir cloroform i realitzar les pertinents centrifugacions s'obtenen tres fases en la mostra (figura 5), una superior aquosa i sense color que conté l'ARN, una interfase blanca que conté l'ADN i una fase inferior vermella que correspon a la fase orgànica, amb proteïnes i altres elements.



**Figura 5. Formació de les tres fases al afegir cloroform a la mostra tractada amb TriPure.** Fase aquosa incolora amb RNA, interfase blanca amb ADN i fase orgànica vermella amb proteïnes i lípids. Imatge de OpenWetWare, 2009

L'ARN es fa precipitar amb isopropanol i es segueix tot un protocol per tal de purificar-lo, utilitzant etanol 75% i tot un seguit d'agitacions, incubacions i centrifugacions en determinats moments. Finalment es resuspèn amb aigua lliure de RNases. Per les dues fases restants s'utilitza etanol 100% per fer precipitar l'ADN, per tant el sobrenedant conté proteïnes i el precipitat l'ADN. En el precipitat d'ADN es realitzen distints rentats per eliminar el fenol utilitzant citrat de sodi 0.1 M i un darrer rentat amb etanol 75%, la mostra resultant es resuspèn amb NaOH 8 mM. Finalment les proteïnes són precipitades amb isopropanol, el precipitat es sotmet a distints rentats d'hidroclorur de guanidina 0.3 M en etanol 95% i d'etanol 100%, i el precipitat resultant es resuspèn amb SDS al 1%.

El protocol detallat es pot consultar en les següents publicacions: Chomczynski, 1993 i la guia *TriPure Isolation Reagent® - Roche (Juny del 2008)*.

Es va canviar el plantejament experimental, degut a problemes en la determinació dels ARNm dels marcadors de biogènesi (una baixa expressió). Per això, per la quantificació de proteïnes mitjançant WB es van utilitzar les proteïnes aïllades amb el reactiu TriPure®, que es va utilitzar pels següents procediments experimentals.

## 4. Western-blot

El Western-blot es tracta d'una tècnica que permet la determinació semi-quantitativa de les proteïnes. Concretament es basa en la separació de les proteïnes en funció del seu pes molecular mitjançant una electroforesis en gel de poliacrilamida i condicions desnaturalitzants (electroforesis SDS-PAGE). Seguidament les proteïnes del gel són transferides i immobilitzades en una membrana de nitrocel·lulosa per realitzar finalment un positivat immunològic amb dos anticossos. L'anticòs primari s'uneix específicament a la proteïna desitjada i el secundari al primari, i a més aquest està conjugat amb un enzim que permetrà el revelat.



### *Quantificació de proteïnes totals*

Per tal que la tècnica permeti una determinació semi-quantitativa de les proteïnes, s'ha de conèixer la concentració concreta de les mostres que es carrega en el gel de poliacrilamida per la seva separació. Per aquest motiu el primer pas es basa en quantificar els nivells de proteïna de les mostres. Hi ha distintes tècniques per realitzar-ho, com el Bradford, Lowry o BCA; però degut a que les mostres provenen de l'aïllament per TriPure®, i per tant contenen el detergent SDS al 1% que interfereix en el Bradford i Lowry (Johnson, 2013), es realitza la quantificació mitjançant el software d'anàlisi de dades Gene5™ de BioTek®. S'utilitza un sistema espectrofotomètric (espectrofotòmetre de Microplaques PowerWave XS de BioTek) i una placa de micro-volums Take3 de BioTek®. En l'apartat de resultats, **figura 9**, es representa la mitjana de la concentració de proteïnes totals presents en els dos grups experimentals.

### *Preparació de mostres*

A continuació es preparen les mostres, la quantitat exacta per tenir la concentració de proteïna desitjada (en aquest cas 30 o 50 µg segons la proteïna, indicat en la **taula 2**). Es completa amb tampó d'homogeneïtzació STE-KCl (Tris 20 mM, Sacarosa 250 mM, EGTA 2 mM i KCl 40 mM, pH 7.4) i finalment s'afegeix el tampó de càrrega (dilució 1:3, tampó de càrrega:mostra). El tampó de càrrega conté glicerol 40% (v/v); que dóna més densitat a les mostres i per tant ajuda a que es dipositin en el fons dels pouets i no difonguin ni sobresurtin d'aquests. També conté SDS 10% (p/v), que és el principal component, es tracta d'un detergent que romp l'estructura terciària de les proteïnes i a més proporciona càrrega negativa a totes les proteïnes. Aquestes seran desnaturalitzades (per tant seran lineals) i així la càrrega adquirida és proporcional al seu pes molecular quedant emmascarada la seva càrrega real. A més conté tampó Tris-HCl 0.25M i beta-mercaptoetanol 10% (v/v) que romp els ponts disulfur de les proteïnes polimèriques. Finalment també presenta colorant blau de bromofenol 0.1% (p/v); és una molècula petita de color blau i amb càrrega negativa, d'aquesta manera migra en el mateix sentit que les proteïnes, però al ser més petita migra més ràpidament que les proteïnes formant un front de color blau davant aquestes. Així es pot veure el desplaçament de la mostra i es sap quan es pot aturar l'electroforesi (Maldonado, 2010).

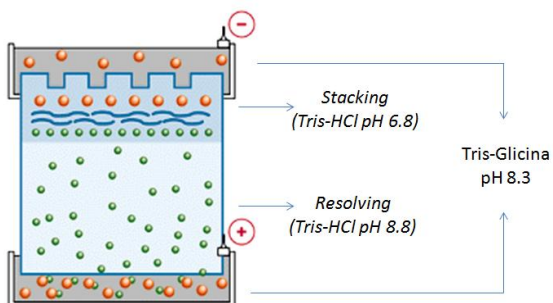
Una vegada s'ha preparat la quantitat adequada de mostra i tampó de càrrega, aquestes es centrifuguen i es posen a bullir per tal de desnaturalitzar completament les proteïnes (Maldonado, 2010).

### *Electroforesi*

L'electroforesi es basa en un joc de pH entre dos gels distintes i el tampó d'electroforesi. D'aquesta manera tenim un pH de 8.3 del tampó d'electroforesi (Tris-base 0.025 M, Glicina 0.192 M, SDS 1% (p/v)). A continuació el gel concentrador (Stacking) presenta un pH de 6.8 i el gel separador (Resolving) presenta un pH de 8.8. Els dos gels contenen Tris-HCl (s'utilitza HCl per ajustar el pH), i el tampó Tris-glicina.

Així al aplicar la corrent elèctrica, els ions de glicina del tampó, els de clor dels gels i les proteïnes de les mostres carregades, tots ells carregats negativament, són forçats a migrar cap al pol positiu, i per tant entren en el gel concentrador (pH 6.8). En aquest gel els ions de clor migren ràpidament i estan al front degut a la seva relació càrrega/massa, al ser petits i estar carregats

negativament migren ràpidament. Per altre banda a pH 6.8 la glicina passa a tenir càrrega pràcticament neutra (ja que el seu punt isoelèctric és de 6.1), i així es redueix la seva mobilitat. Finalment les proteïnes de les mostres es concentren entre aquests dos fronts, ja que no poden migrar més ràpidament que els ions clorur, com es pot observar en la [figura 6](#). Al arribar al gel separador (pH 8.8), les molècules de glicina migren més ràpidament que les proteïnes ja que a un pH superior al seu pI queden carregades negativament. D'aquesta manera totes les proteïnes començaran a separar-se a la vegada, si no fos així es separarien en distints moments i s'obtidrien bandes difuses i amb coa (Maldonado, 2010).



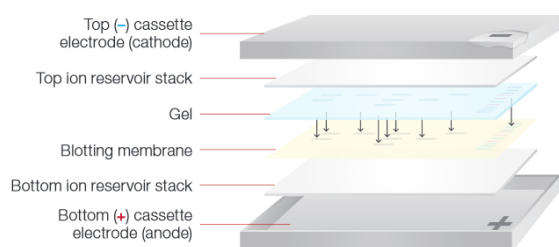
**Figura 6. Representació d'una electroforesis SDS-PAGE.** Es representen les proteïnes desnaturalitzades i amb càrrega negativa (línia de color blau obscur), els ions clorur (esferes verdes) i les molècules de glicina (esferes taronges). Concretament es pot veure com es concentren les proteïnes al entrar en el gel stacking, que es troben entre els dos fronts (l'inferior d'ions clorur i el superior de glicina). Adaptació de la imatge de National Diagnostics, 2011.

Els dos gels tenen diferent proporció de Tris-SDS, acrilamida 30%, aigua bidestilada, PSA 10% i TEMED, en funció del pes molecular de les proteïnes a separar. Així es pot escollir el gruix del gel, que afecta a la eficàcia de la posterior transferència (quan més prim més fàcil és la transferència) i a la quantitat de mostra que es pot carregar en cada pouet. Per altre banda també es pot escollir la concentració d'acrilamida en el gel, que també afecta a la eficàcia de la transferència (quan més acrilamida, més difícil és la transferència). D'aquesta manera per les proteïnes més grans s'utilitza un grosser i un percentatge d'acrilamida menor (en la [taula 2](#) s'indiquen els percentatges utilitzats segons el pes molecular de la proteïna a estudiar). El PSA i el TEMED són els catalitzadors de la polimerització dels gels, ja que són respectivament un generador i un estabilitzador de radicals lliures. L'acrilamida espontàniament polimeritza, però de manera molt lenta, en canvi amb la presència de radicals lliures aquest procés és veu molt accelerat (Maldonado, 2010). Per aquest motiu el PSA i TEMED es posen en el darrer moment.

Es deixa córrer uns 45 minuts a 200V. Però s'ha d'anar vigilant el front, ja que si el gel és molt lax amb aquest temps es poden perdre alguna de les bandes menys pesades.

### Electrotransferència

Mitjançant l'aplicació d'una corrent elèctrica es transfereixen les proteïnes, que prèviament s'han separat a un gel d'acrilamida mitjançant electroforesi, a una membrana de nitrocel·lulosa (es poden utilitzar altres tipus). En aquest cas s'utilitza el sistema de transferència TransBlot® turbo™ transfer pack de BioRad (Hercules, CA, USA), i en concret s'aplica el protocol Standard de 30 minuts del TransBlot® turbo™ system i es segueixen les indicacions del fabricant (ja es venen les membranes preparades amb els papers i tampó). L'ordre dels distints elements per la transferència s'indica en la [figura 7](#), es posa la membrana a la part inferior i al damunt el gel, ja que les proteïnes al estar carregades negativament migren cap al pol positiu.



**Figura 7. Ordre dels components necessaris per l'electrotransferència.** Imatge obtinguda de BioTechniques, 2012.

### Tinció dels gels

Una vegada realitzada l'electrotransferència es comprova que s'han transferit correctament totes les proteïnes, per això es realitza una tinció del gel i es constata que no han quedat bandes en aquest. Així, s'utilitza una solució de tinció (Comassie Blue 0.1%, metanol 50% i àcid acètic 10%). Seguidament es destenyeix el gel amb una solució de destinció (metanol 50% i àcid acètic 10%) i finalment es posa en aigua perquè recuperi la seva mida normal (es rehidrata).

### Immunodetecció

Primer de tot es fa un bloqueig per tal de disminuir les unions inespecífiques de l'anticòs primari. En aquest cas el bloqueig s'ha realitzat amb llet en pols, específicament s'ha utilitzat un 5% de llet en pols en TBS-T (TBS al 0.1% de Tween20). Aquest bloqueig s'ha deixat *over-night* en el cas de la COX IV i actina, i durant 1 hora en el cas de la PGC1 $\alpha$  i TFAM (**taula 2**). El temps del bloqueig depèn de l'especificitat de l'anticòs primari.

Seguidament es fan un conjunt de rentats amb TBS-T, un de 15 minuts i dos de 5 minuts. L'objectiu és eliminar restes de llet en pols, ja que poden interferir en l'acció de l'anticòs primari. A continuació s'aplica l'anticòs primari, en la dilució adequada, en una solució de TBS-T al 5% de BSA i 0.05% de azida sòdica (que actua com a conservant). Específicament les condicions utilitzades per les distintes proteïnes són les que s'indiquen en la **taula 2**. Es tornen a realitzar els 3 rentats amb TBS-T de 15 i 5 minuts, i s'introdueix l'anticòs secundari (en una solució de TBS-T al 1% de llet en pols) (condicions indicades en la **taula 2**), que ve definit per l'hoste on s'ha desenvolupat l'anticòs primari. Així els anticossos secundaris s'uniran als primaris, a més com que els secundaris estan conjugats amb peroxidasa de rave (horseradish peroxidase o HRP), es podrà utilitzar la quimioluminescència pel revelat. Finalment es fan dos rentats amb TBS-T de 15 i 5 minuts, i un darrer de 10 minuts amb TBS 1x, perquè el Tween pot interferir amb el revelat.

**Taula 2. Característiques i condicions aplicades per realitzar el WB de COX IV, Actina, PGC1 $\alpha$  i TFAM**

Proteïna	Condicions					
	PM (KDa)	Gel (%)	Conc. proteïnes carregades ( $\mu$ g)	Bloqueig	AC primari	AC secundari
COX IV	17 KDa	12 % 1.5 mm	30 $\mu$ g	o/n	1:500 1 h	1:40000 1h (mouse)
Actina	45 KDa	12 % 1.5 mm	30 o 50 $\mu$ g*	o/n	1:1000 1h	1:10000 1h (mouse)
PGC1 $\alpha$	90.457 KDa	12 % 1.5 mm	50 $\mu$ g	1 h	1:200 o/n	1:10000 1h (rabbit)
TFAM	25 KDa	12 % 1.5 mm	50 $\mu$ g	1 h	1:200 o/n	1:30000 1h (goat)

\* L'actina s'utilitza com a control de càrrega, per això la concentració que es carrega es de 30  $\mu$ g en el cas de la COX IV, però de 50  $\mu$ g per la resta de proteïnes. S'indica el pes molecular de les proteïnes, el percentatge d'acrilamida del gel utilitzat i el seu grossor, la quantitat de proteïna que es carrega, el temps que s'aplica el bloqueig de llet en pols al 5%, la concentració i temps que s'aplica l'anticòs primari i el secundari, com també el tipus de secundari.

#### Revelat

Hi ha distints mètodes de revelat, però en aquest cas s'utilitza un enzim unit a l'anticòs secundari, es tracta de la peroxidasa de rave (HRP). Aquest enzim catalitza la reacció d'oxidació del luminol en presència de peròxid d'hidrogen, aquesta reacció produeix llum que pot ser captada per un instrument apropiat, s'ha utilitzat el captador Chemidoc XRS system, de BioRad (Hercules, CA, USA). El revelat es fa utilitzant el kit de BioRad (Inmunostar Western Chemiluminescence kit, BioRad 170-5070), es mesclen dues solucions en igual proporció, una de luminol i una solució de peròxid d'hidrogen, i es detecta la quimioluminiscència amb el sistema de captació Chemidoc. La quantificació es realitza amb el software d'anàlisi Quantity One $\text{\textcircled{C}}$  de BioRad (Hercules, CA, USA).

Les bandes obtingudes apareixen a un pes molecular de uns 16 KDa per la COX IV, 21 KDa per TFAM i 68 KDa per la PGC1 $\alpha$ . I com a control de càrrega s'ha utilitzat actina, que apareix a uns 50 KDa. En l'apartat de resultats, [figura 10](#), es veuen algunes bandes representatives dels WB realitzats.

## 5. Anàlisi estadístic

Tots els resultats es representen en forma de la mitjana per grup d'animals (n=6)  $\pm$  l'error estàndard de la mitjana. Les diferències entre els grups experimentals són analitzades pel test de la t-Student. El software utilitzat per l'anàlisi estadístic és el Microsoft Office Excel 2007 de Windows (Chicago, IL, USA). Els resultats es consideren estadísticament significatius a partir de  $p < 0.05$ .

# RESULTATS I DISCUSSIÓ

## 1. Paràmetres biomètrics

Tot i que els resultats de biometria corresponen a treballs previs (Nadal-Casellas et al., 2010 i Gómez-Pérez et al., 2012), és interessant mencionar-los, especialment els pesos corporals, l'adipositat i la ingesta d'aliments, per conèixer els canvis més importants induïts per la HFD.

A la **taula 3** es pot observar el pes corporal final de cada grup experimental. Així, considerant que el pes inicial mitjà era de  $332 \pm 4$  g, es pot calcular el guany de pes, que és superior a les rates alimentades amb una dieta rica en greix. D'aquesta manera la HFD suposa un increment del 22.8% del pes de les rates mascle en relació al grup control (Nadal-Casellas et al., 2010). També es representa (**taula 3**) el pes dels depòsits de greix, l'índex d'adipositat i la ingesta energètica, que com podem veure, augmenten significativament en el grup HFD en comparació al control.

Per altre banda, a la **taula 4**, es presenta la composició nutricional i la quantitat consumida per les rates de cada aliment que conforma la dieta de cafeteria. Doncs una setmana abans del sacrifici es va mesurar la ingesta energètica (representat a la **taula 3**) i la ingesta concreta de cada aliment de la dieta rica en greixos (representat a la **taula 4**). Així es veu (**taula 4**), que els aliments que van consumir més són la cansalada fresca i el paté de fetge de porc.

Com veïem a la **taules 3**, els pesos corporals, el guany de pes, els depòsits de greix, l'índex d'adipositat i la ingesta energètica és superior en el grup HFD en comparació al control. Això ens indica que els animals del grup HFD mengen més i així els pesos corporals s'incrementen a conseqüència de l'augment dels depòsits de greix i l'índex d'adipositat. A més aquestes diferències són estadísticament significatives ( $p < 0.05$ ). Així doncs, amb aquests resultats, es pot concloure que la dieta HFD és eficaç en la inducció de l'obesitat.

**Taula 3. Pes corporal, adipositat i ingesta energètica de les rates mascle control i HFD.** Adaptació de Nadal-Casellas et al., 2010; Gómez-Pérez et al., 2012.

<i>Paràmetre</i>	<i>Rates mascle control</i>	<i>Rates mascle HFD</i>
<b>Pes corporal (g)</b>	555 ± 12	671 ± 23
<b>Guany de pes (g)</b>	225 ± 11	336 ± 22
<b>Pes depòsits de greix (g)</b>	57.2 ± 5.3	106 ± 8
<b>Índex d'adipositat (g/100 g pes corporal)</b>	10.1 ± 0.8	15.5 ± 0.6
<b>Ingesta energètica (Kcal/Kg · dia)</b>	169 ± 7	269 ± 11

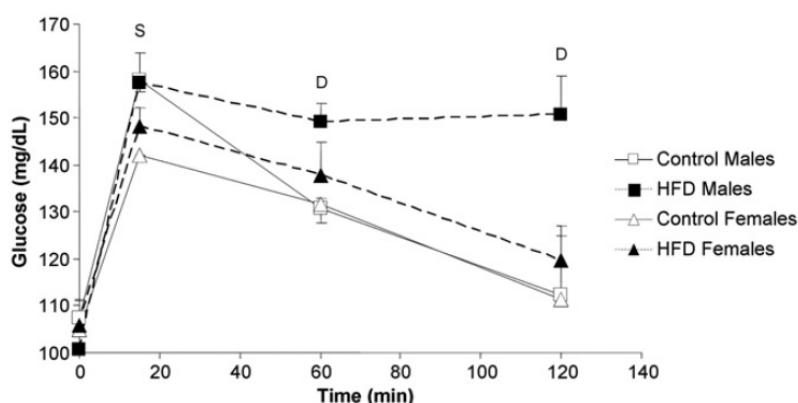
*El guany de pes corporal es mesura com la diferència entre el pes final i inicial de cada animal. Els depòsits de greix pesats són l'inguinal, el gonadal, el mesentèric i el lumbar. L'índex d'adipositat és el pes dels depòsits de greix en relació a 100 g de pes corporal. Tots els valors es representen en forma de mitjana ± l'error estàndard, de 6 animals per grup experimental. A més tots els paràmetres presenten diferències significatives ( $p < 0.05$ ) en relació al grup control i HFD (dieta rica en greixos) (Nadal-Casellas et al., 2010; Gomez-Perez et al., 2012).*

**Taula 4. Composició nutricional i ingesta de la dieta de cafeteria (HFD)** (Adaptació de Gomez-Perez et al., 2012)

Aliments HFD	Quantitat consumida (g/100 g dieta)	Proteïnes	Carbohidrats (g /100 g d'aliment)	Lípids
<b>Cansalada fresca</b>	46.1 ± 2.7	17.3	-	29.9
<b>Galetes</b>	2.80 ± 0.89	5.82	68.0	21.3
<b>Paté de fetge de porc</b>	26.1 ± 2.1	11.9	2.70	29.5
<b>Ensaïmada</b>	15.2 ± 1.9	8.10	50.6	29.1
<b>Xocolata</b>	4.35 ± 0.97	6.70	60.0	30.0

La quantitat consumida es refereix a la quantitat (en grams) d'aliment consumit en relació a 100 g de dieta consumida. El valors es representen com la mitjana d'aliment consumit ± l'error estàndard, en una mostra de 12 rates. Per altre banda la composició nutricional de cada aliment (proteïnes, carbohidrats i lípids) es representa com a grams de nutrient en 100 g d'aliment (Gomez-Perez et al., 2012).

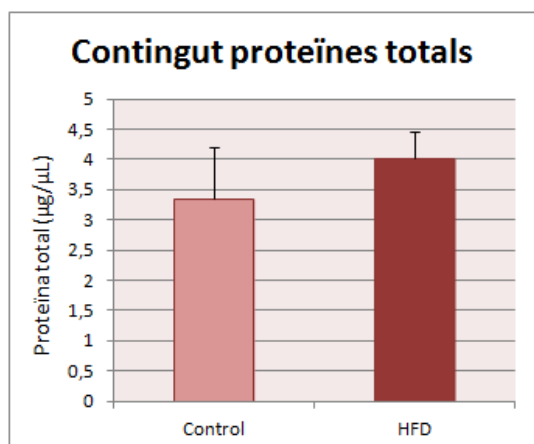
És important remarcar que la dieta hiperlipídica administrada, a més de ser obesogènica, també produeix canvis en la tolerància a la glucosa. Així, tal com es pot veure a la [figura 8](#), les rates HFD mostren un descens significatiu de la tolerància a la glucosa, que és paral·lel a una disminució de la sensibilitat a la insulina (Amengual-Cladera et al., 2012b).



**Figura 8. Curva de la tolerància a la glucosa.** Es representa el promig dels 6 animals que conformen cada grup experimental i els errors estàndard respectius (mitjana ± error estàndard). ANOVA ( $p < 0.05$ ). S indica efecte significatiu de les diferències entre sexe, i D de les diferències de la dieta. Imatge de: (Amengual-Cladera et al., 2012b).

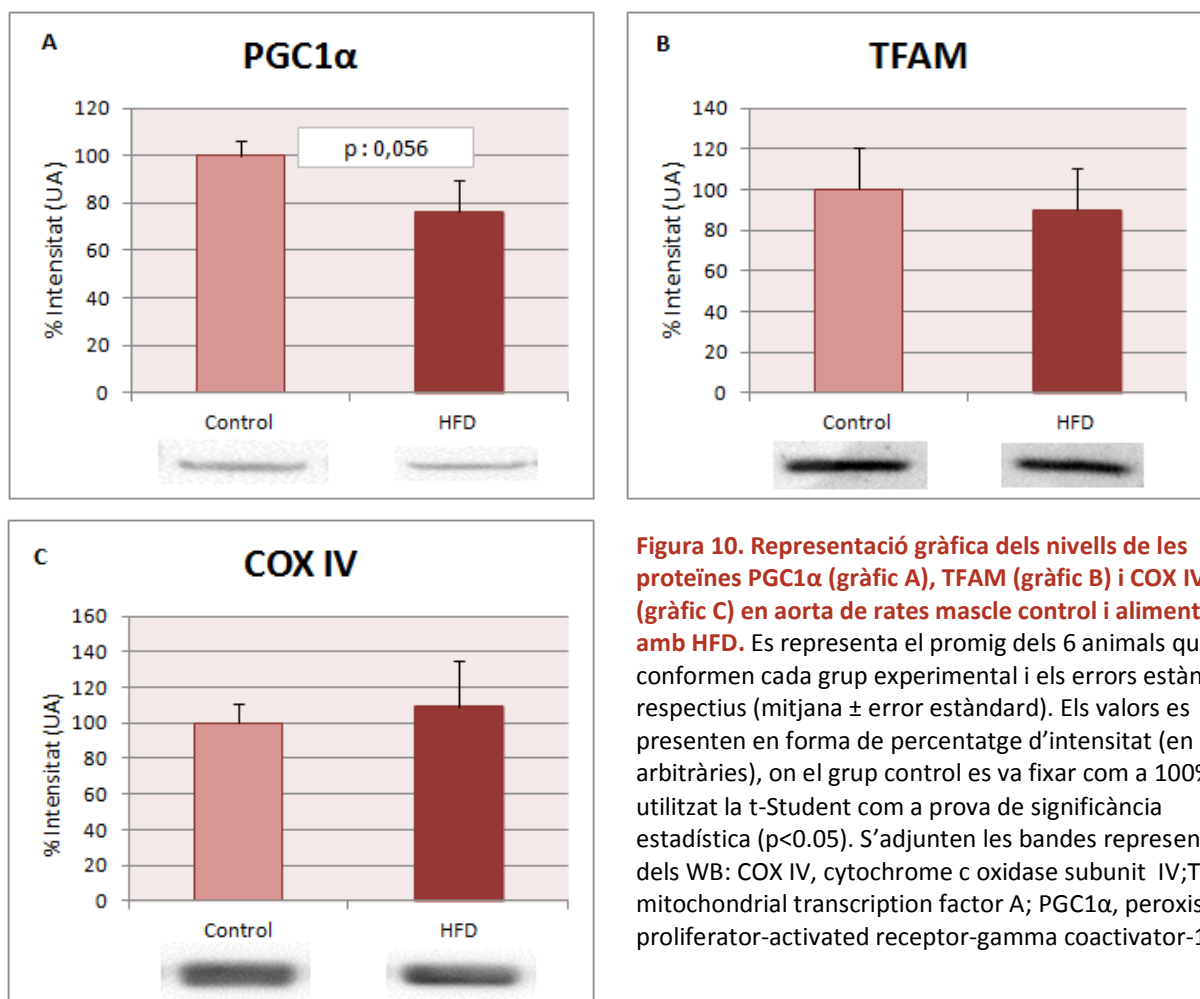
## 2. Marcadors de biogènesi mitocondrial

En quant al contingut de proteïnes totals al teixit aòrtic ([figura 9](#)), no hi ha diferències significatives entre ambdós grups experimentals.



**Figura 9. Representació gràfica del contingut proteic total en aorta de rates mascle control i alimentades amb una dieta rica en greixos (HFD).** Es representa el promig dels 6 animals que conformen cada grup experimental i els errors estàndard respectius (mitjana ± error estàndard), en forma de µg de proteïna per µL totals de mostra.

A la **figura 10** es representen els resultats de les proteïnes marcadores de la biogènesi mitocondrial analitzades al present treball experimental, específicament, PGC1 $\alpha$ , TFAM i COX IV al teixit aòrtic i en ambdós grups experimentals. Com es pot comprovar, els nivells de PGC1 $\alpha$  i TFAM tendeixen a disminuir als animals obesos, especialment el PGC1 $\alpha$  ( $p=0.056$ ). Pel que fa als nivells de la proteïna COX IV, els valors són semblants als dos grups experimentals.



**Figura 10. Representació gràfica dels nivells de les proteïnes PGC1 $\alpha$  (gràfic A), TFAM (gràfic B) i COX IV (gràfic C) en aorta de rates mascle control i alimentades amb HFD.** Es representa el promig dels 6 animals que conformen cada grup experimental i els errors estàndard respectius (mitjana  $\pm$  error estàndard). Els valors es presenten en forma de percentatge d'intensitat (en unitats arbitràries), on el grup control es va fixar com a 100%. S'ha utilitzat la t-Student com a prova de significància estadística ( $p < 0.05$ ). S'adjunten les bandes representatives dels WB: COX IV, cytochrome c oxidase subunit IV; TFAM, mitochondrial transcription factor A; PGC1 $\alpha$ , peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 $\alpha$ .

El tractament dietètic utilitzat ha possibilitat l'obtenció d'un grup experimental d'animals que ha experimentat una hiperfàgia voluntària i un increment de pes corporal del 23%, paral·lelament al augment de l'adipositat. Des del punt de vista metabòlic, els animals presenten una disminució de la tolerància a la glucosa i un perfil sistèmic i tissular de resistència a la insulina (Amengual-Cladera et al., 2012b).

Com s'ha comentat al llarg del treball, el paper del mitocondri en el metabolisme cel·lular és clau, ja que és on es realitza la fosforilació oxidativa, que és el procés mitjançant el qual s'obté la major part de l'energia que necessita la cèl·lula. S'ha descrit que la biogènesi mitocondrial, un procés complex que engloba la proliferació mitocondrial (augment del nombre de mitocondris) i la diferenciació mitocondrial (increment en el contingut de proteïnes funcionals), augmenta en situacions fisiològiques o patològiques de demanda energètica i de disfunció mitocondrial com per exemple l'estrès oxidatiu (Amengual-Cladera, 2012; Ventura-Clapier et al., 2008). Així s'ha vist que en



moltes patologies (obesitat, diabetis, càncer...) es veu afectada la funció mitocondrial, per la qual cosa el mitocondri es converteix en una diana d'estudi molt interessant per dissenyar nous fàrmacs que puguin actuar sobre aquest orgànu. Així, es presenta especial interès en estudiar els paràmetres que regulen la biogènesi mitocondrial. S'ha vist que el PGC1 $\alpha$  és el principal regulador d'aquest procés, actua com a nexa entre els estímuls externs i els canvis en la funció mitocondrial. Així, al augmentar la demanda energètica s'incrementa l'expressió de PGC1 $\alpha$ , que promou l'expressió de gens nuclears, com per exemple els NRF. Aquests, activen l'expressió de gens codificants de proteïnes relacionades amb la funció mitocondrial, com per exemple el TFAM, que és translocat al mitocondri on actua com a factor clau per la correcta replicació i expressió del genoma mitocondrial. Per tant el TFAM actua com a nexa entre el genoma nuclear i mitocondrial, permetent la coordinació dels dos genomes, fet imprescindible pel correcte funcionament mitocondrial.

En aquest sentit, s'han descrit canvis importants de la funció mitocondrial en resposta a la dieta hiperlipídica a diferents teixits. Així, per exemple en el TAM, s'ha demostrat que la HFD millora la diferenciació mitocondrial en les rates mascle (Nadal-Casellas et al., 2013). Al múscul esquelètic, també s'ha vist que la HFD indueix la biogènesi mitocondrial, especialment en mascles, actuant com a mecanisme compensador del d'any oxidatiu associat a la HFD (Gomez-Perez et al., 2012). Al fetge, la HFD produeix una major proliferació mitocondrial i una menor diferenciació mitocondrial (Nadal-Casellas et al., 2010). Per aquest motiu, pel que fa a l'aorta, els resultats obtinguts en el present treball experimental no són els esperats ja que no s'han observat canvis significatius en els marcadors de biogènesi estudiats.

Per altre banda, l'augment de l'índex d'adipositat als animals HFD està íntimament relacionat amb el desenvolupament d'un estat pro-inflamatori i de resistència a la insulina, tal i com es posa de manifest per canvis al patró d'adipoquines (increment de TNF $\alpha$ , IL-6, resistina i leptina, i disminució d'adiponectina) a nivell de teixit adipós i amb canvis paral·lels dels seus nivells sèrics (Amengual-Cladera et al., 2012b). A més, aquest augment d'adipositat, també condueix a un estat d'estrès oxidatiu, ja que s'incrementa el flux d'electrons de la CRM, pel que es produeixen més ROS, i per contra, al estar debilitats els mecanismes de defensa antioxidants, no es pot pal·liar aquest dany. D'aquesta manera, si no es millora l'eficàcia de la CRM, l'excés de ROS produeix danys tant al mitocondri com a la cèl·lula (peroxidació dels lípids, modificació de proteïnes i mutació de l'ADN) (Nadal-Casellas et al., 2010). Per això, la diferenciació mitocondrial al millorar l'eficàcia de la CRM (Justo et al., 2005), protegeix davant aquests danys associats a la HFD, actua com a mecanisme adaptador. Això es va observar en l'estudi de Nadal-Casellas et al., 2013 del TAM, les rates mascle d'aquest estudi presentaven un augment de la diferenciació mitocondrial i així no s'esdevenia l'acumulació d'àcids grassos, l'estrès oxidatiu o la RI.

També s'ha descrit que l'estat pro-inflamatori i d'estrès oxidatiu present en determinades situacions patològiques (com l'obesitat o diabetis), podria ser responsable de les alteracions en la funcionalitat de l'endoteli vascular, que es considera l'origen de les malalties cardiovasculars (CV) (Cohen i Tong, 2010; Ballinger et al., 2002). En aquest sentit, l'aorta és un vas sanguini que sovint s'utilitza pel desenvolupament d'estudis de disfunció endotelial, que també es manifesta per alteracions de la funció mitocondrial (Addabbo et al., 2009).

Així, amb el present treball es pretenia conèixer quin efecte té la ingesta d'una dieta rica en greixos en la biogènesi mitocondrial en el teixit aòrtic, i per tant indirectament conèixer l'efecte en la disfunció endotelial. Però, segons els resultats presentats (figura 10), la dieta rica en greixos (HFD) no



produeix canvis significatius en els paràmetres de la biogènesi mitocondrial al teixit aòrtic, tot i que sí que es veu certa tendència al descens, especialment en el cas del PGC1 $\alpha$ , que mostra unes diferències quasi significatives respecte el grup control. No obstant, aquests resultats no són concloents, es complex arribar a una conclusió degut a la seva dispersió (els errors estàndard són elevats). Per tant no es poden descartar canvis en la funció mitocondrial a l'aorta. Per això seria interessant augmentar el nombre d'animals per grup experimental, incloure altres paràmetres marcadors, com per exemple l'ADNmt (indicador del contingut en mitocondris) i tenir en compte altres variables experimentals, com són el tipus de dieta (composició lipídica més rica en àcids grassos saturats i colesterol) i el temps de tractament (més prolongat).

## CONCLUSIONS

---

1. L'alimentació amb la dieta hiperlipídica, denominada de cafeteria, és eficaç en la inducció de l'obesitat, ja que s'ha demostrat que produeix un augment de la ingesta energètica i de l'adipositat, provocant un increment del 23% del pes corporal a les rates mascle. A més, la dieta hiperlipídica també produeix una disminució de la tolerància a la glucosa, que es manifesta amb una disminució de la sensibilitat a la insulina.
2. L'augment de l'adipositat dels animals alimentats amb la dieta hiperlipídica es relaciona amb un estat pro-inflamatori, la qual cosa està associada amb alteracions en la funcionalitat de l'endoteli i, per tant, amb la funcionalitat mitocondrial. No obstant això, no s'observen canvis significatius als nivells de marcadors de la biogènesi mitocondrial al teixit aòrtic.
3. Degut a la dispersió dels resultats obtinguts, es pot suggerir una tendència a una disminució de la biogènesi mitocondrial a l'aorta, la qual cosa contrasta amb els resultats obtinguts prèviament a altres teixits en les mateixes condicions experimentals, que presentaven canvis substancials en la seva funció i biogènesi mitocondrial, com a mecanisme compensatori per pal·liar l'efecte deleteri de la dieta hiperlipídica.

## PERSPECTIVES FUTURES

---

Per completar aquest estudi seria interessant, primer de tot, repetir l'experiment presentat per determinar si els resultats obtinguts són els correctes o no, ja que segons la bibliografia consultada s'esperen diferències significatives. Per això es podria augmentar el nombre d'animals per grup experimental, o en lloc d'utilitzar proteïnes obtingudes amb el procediment del TriPure $\text{®}$ , com s'ha fet en aquest treball, utilitzar l'homogenat directa del teixit aòrtic, per veure si el procediment usat ha afectat a la qualitat de les mostres. També seria interessant incloure altres paràmetres marcadors, com per exemple l'ADNmt (indicador del contingut en mitocondris), o realitzar les activitats de la COX IV o de la citrat sintasa. També es podrien utilitzar altres condicions experimentals, com per exemple el tipus de dieta (dieta més rica en àcids grassos saturats i



colesterol) i el temps de tractament (més prolongat). També es podrien fer estudis in vitro amb cèl·lules endotelials d'aorta.

Per altre banda, es podrien incloure rates femelles, per determinar si hi ha dimorfisme sexual en la biogènesi mitocondrial del teixit aòrtic. Ja que, en molts teixits, com el múscul esquelètic (Colom et al., 2007a), el fetge (Nadal-Casellas et al., 2010; Justo et al., 2005; Valle et al., 2007), cervell (Nadal-Casellas et al., 2011), cor (Colom et al., 2007b), o TAM (Guevara et al., 2009), s'ha descrit, veient-se una major diferenciació i capacitat oxidativa mitocondrial en femelles.

També es pot observar com es veu afectada la via de senyalització de la insulina, i per tant estudiar com afecta la HFD a la sensibilitat a la insulina. O també veure com es veu afectat el metabolisme oxidatiu, i per tant determinar paràmetres d'estrès oxidatiu, d'activitats antioxidants i de termogènesi (nivells de UCPs). De fet, s'han descrit diferències entre sexe en quant a la resistència a la insulina i l'activitat antioxidant en resposta a una HFD en el múscul esquelètic (Gomez-Perez et al., 2012).

Finalment, ja mirant a llarg termini, es podria avaluar i desenvolupar estratègies per modular la regulació de la biogènesi mitocondrial. D'aquesta manera es podrien dissenyar noves intervencions terapèutiques per l'ampli grup de patologies que estan associades a la disfunció mitocondrial, com per exemple la diabetis i les malalties cardiovasculars. Per exemple ja s'ha vist que el resveratrol (un tipus de fenol present en la pell del raïm) activa a la SIRT1 i aquesta pot activar la PGC1 $\alpha$  i la biogènesi mitocondrial, augmentant el contingut mitocondrial (Csiszar et al., 2009). De fet en estudis amb ratolins s'ha vist que el tractament amb resveratrol els protegia contra l'obesitat induïda per la dieta i la resistència a la insulina (Lagouge et al., 2006).

## REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

- Addabbo, F., B. Ratliff, H. C. Park, M. C. Kuo, Z. Ungvari, A. Csiszar, B. Krasnikov, K. Sodhi, F. Zhang, A. Nasjletti, and M. S. Goligorsky. 2009. "The Krebs cycle and mitochondrial mass are early victims of endothelial." *Am J Pathol* no. 174 (1):34-43. doi: 10.2353/ajpath.2009.080650.
- Amengual-Cladera, E. 2012. "Dimorfismo sexual en la función y biogénesis mitocondriales en el tejido adiposo blanco de rata. Respuesta a una dieta hiperlipídica." *TDX (Tesis Doctorals en Xarxa)*. doi: <http://hdl.handle.net/10803/84120>.
- Amengual-Cladera, E., I. Llado, M. Gianotti, and A. M. Proenza. 2012b. "Sex differences in the effect of high-fat diet feeding on rat white adipose tissue mitochondrial function and insulin sensitivity." *Metabolism* no. 61 (8):1108-17. doi: 10.1016/j.metabol.2011.12.016.
- Andersson, U., and R. C. Scarpulla. 2001. "Pgc-1-related coactivator, a novel, serum-inducible coactivator of nuclear respiratory factor 1-dependent transcription in mammalian cells." *Mol Cell Biol* no. 21 (11):3738-49. doi: 10.1128/mcb.21.11.3738-3749.2001.
- Antuna-Puente, B., B. Feve, S. Fellahi, and J. P. Bastard. 2008. "Adipokines: the missing link between insulin resistance and obesity." *Diabetes Metab* no. 34 (1):2-11. doi: 10.1016/j.diabet.2007.09.004.
- Ballinger, S. W. 2005. "Mitochondrial dysfunction in cardiovascular disease." *Free Radic Biol Med* no. 38 (10):1278-95. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2005.02.014.
- Ballinger, S. W., C. Patterson, C. A. Knight-Lozano, D. L. Burow, C. A. Conklin, Z. Hu, J. Reuf, C. Horaist, R. Lebovitz, G. C. Hunter, K. McIntyre, and M. S. Runge. 2002. "Mitochondrial integrity and function in atherogenesis." *Circulation* no. 106 (5):544-9.
- Barp, J., A. S. Araujo, T. R. Fernandes, K. V. Rigatto, S. Llesuy, A. Bello-Klein, and P. Singal. 2002. "Myocardial antioxidant and oxidative stress changes due to sex hormones." *Braz J Med Biol Res* no. 35 (9):1075-81.
- Baur, J. A., and D. A. Sinclair. 2006. "Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence." *Nat Rev Drug Discov* no. 5 (6):493-506. doi: 10.1038/nrd2060.
- Benito, C. 2013. "Replicación del ADN mitocondrial: lazos D." Available from <http://pendientedemigracion.ucm.es/info/genetica/grupod/Replicacion/Replicacion.htm#LazoD>.

- Beyer, T. A., W. Xu, D. Teupser, U. auf dem Keller, P. Bugnon, E. Hildt, J. Thiery, Y. W. Kan, and S. Werner. 2008. "Impaired liver regeneration in Nrf2 knockout mice: role of ROS-mediated." *Embo j* no. 27 (1):212-23. doi: 10.1038/sj.emboj.7601950.
- BioTechniques. 2012. "Protocol guide. Trans-Blot Turbo Transfer System." *Biotechniques - The International Journal for Life Science Method*. Available from [http://www.biotechniques.com/protocols/2012\\_Protocol\\_Guide/Trans-Blot-Turbo-Transfer-System/biotechniques-325107.html?service=print](http://www.biotechniques.com/protocols/2012_Protocol_Guide/Trans-Blot-Turbo-Transfer-System/biotechniques-325107.html?service=print).
- Borras, C., J. Sastre, D. Garcia-Sala, A. Lloret, F. V. Pallardo, and J. Vina. 2003. "Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower." *Free Radic Biol Med* no. 34 (5):546-52.
- Boveris, A., and B. Chance. 1973. "The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen." *Biochem J* no. 134 (3):707-16.
- Cai, H., Z. Li, S. Dikalov, S. M. Holland, J. Hwang, H. Jo, S. C. Dudley, Jr., and D. G. Harrison. 2002. "NAD(P)H oxidase-derived hydrogen peroxide mediates endothelial nitric oxide production in response to angiotensin II." *J Biol Chem* no. 277 (50):48311-7. doi: 10.1074/jbc.M208884200.
- Campos, Y., Pineda, M., García Silva, MT., Montoya, J. and Antoni L. 2013. "13. Enfermedades mitocondriales. Protocolo de diagnóstico y tratamiento de las enfermedades mitocondriales" Available from <http://ae3com.eu/protocolos/protocolo13.pdf>.
- Casademont, J., and O. Miro. 2002. "Electron transport chain defects in heart failure." *Heart Fail Rev* no. 7 (2):131-9.
- Chomczynski, P. 1993. "A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples." *Biotechniques* no. 15 (3):532-4, 536-7.
- Chowanadisai, W., K. A. Bauerly, E. Tchapanian, A. Wong, G. A. Cortopassi, and R. B. Rucker. 2010. "Pyrroloquinoline quinone stimulates mitochondrial biogenesis through cAMP response element-binding protein phosphorylation and increased PGC-1alpha expression." *J Biol Chem* no. 285 (1):142-52. doi: 10.1074/jbc.M109.030130.
- Cohen, R. A., and X. Tong. 2010. "Vascular oxidative stress: the common link in hypertensive and diabetic vascular disease." *J Cardiovasc Pharmacol* no. 55 (4):308-16.
- Colom, B., M. P. Alcolea, A. Valle, J. Oliver, P. Roca, and F. J. Garcia-Palmer. 2007a. "Skeletal muscle of female rats exhibit higher mitochondrial mass and oxidative-phosphorylative capacities compared to males." *Cell Physiol Biochem* no. 19 (1-4):205-12. doi: 10.1159/000099208.
- Colom, B., J. Oliver, P. Roca, and F. J. Garcia-Palmer. 2007b. "Caloric restriction and gender modulate cardiac muscle mitochondrial H2O2 production and oxidative damage." *Cardiovasc Res* no. 74 (3):456-65. doi: 10.1016/j.cardiores.2007.02.001.
- Csiszar, A., N. Labinskyy, J. T. Pinto, P. Ballabh, H. Zhang, G. Losonczy, K. Pearson, R. de Cabo, P. Pacher, C. Zhang, and Z. Ungvari. 2009. "Resveratrol induces mitochondrial biogenesis in endothelial cells." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* no. 297 (1):H13-20. doi: 10.1152/ajpheart.00368.2009.
- Dhalla, N. S., R. M. Temsah, and T. Netticadan. 2000. "Role of oxidative stress in cardiovascular diseases." *J Hypertens* no. 18 (6):655-73.
- Eiris Puñal, J., Gómez Lado, C., Oscar Blanco Barca, M. and Castro-Gago, M. 2008. "Enfermedades mitocondriales." *Asociación Española de Pediatría*. Available from <http://www.aeped.es/sites/default/files/documentos/15-enfmitocon.pdf>.
- Falkenberg, M., M. Gaspari, A. Rantanen, A. Trifunovic, N. G. Larsson, and C. M. Gustafsson. 2002. "Mitochondrial transcription factors B1 and B2 activate transcription of human." *Nat Genet* no. 31 (3):289-94. doi: 10.1038/ng909.
- Felty, Q., W. C. Xiong, D. Sun, S. Sarkar, K. P. Singh, J. Parkash, and D. Roy. 2005. "Estrogen-induced mitochondrial reactive oxygen species as signal-transducing messengers." *Biochemistry* no. 44 (18):6900-9. doi: 10.1021/bi047629p.
- Gamero de Luna, EJ. and Gamero Estévez, E. 2012. "Enfermedades mitocondriales." *44 Med fam Andal* Vol. 13, Nº. 3. Available from [http://www.samfyc.es/Revista/PDF/v13n3/v13n3\\_06\\_artRevision.pdf](http://www.samfyc.es/Revista/PDF/v13n3/v13n3_06_artRevision.pdf).
- Garstka, H. L., W. E. Schmitt, J. Schultz, B. Sogl, B. Silakowski, A. Perez-Martos, J. Montoya, and R. J. Wiesner. 2003. "Import of mitochondrial transcription factor A (TFAM) into rat liver mitochondria." *Nucleic Acids Res* no. 31 (17):5039-47.
- Gomez-Perez, Y., G. Capllonch-Amer, M. Gianotti, I. Llado, and A. M. Proenza. 2012. "Long-term high-fat-diet feeding induces skeletal muscle mitochondrial biogenesis in rats in a sex-dependent and muscle-type specific manner." *Nutr Metab (Lond)* no. 9:15. doi: 10.1186/1743-7075-9-15.
- Gray, H. 1918. "Anatomy of the Human Body. The Aorta." Available from <http://www.bartleby.com/107/142.html>.
- Guevara, R., F. M. Santandreu, A. Valle, M. Gianotti, J. Oliver, and P. Roca. 2009. "Sex-dependent differences in aged rat brain mitochondrial function and oxidative stress." *Free Radic Biol Med* no. 46 (2):169-75. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.09.035.
- Hernández, M., J. Alfredo, A. Solomon, and P. Cordero. 2007. "Eficiencia y metabolismo mitocondrial: ¿un eje etiológico de la obesidad?" *Revista de medicina*, Vol. 51, Nº. 3, 2007, págs. 13-18. doi: <http://dialnet.unirioja.es/servlet/dcart?info=link&codigo=2434158&orden=139637>.
- Holloway, B. J., D. Rosewarne, and R. G. Jones. 2011. "Imaging of thoracic aortic disease." *Br J Radiol* no. 84 Spec No 3:S338-54. doi: 10.1259/bjr/30655825.

- Hoyenga, K. B., and K. T. Hoyenga. 1982. "Gender and energy balance: sex differences in adaptations for feast and famine." *Physiol Behav* no. 28 (3):545-63.
- Hyde. 2013. "McGraw-Hill Answers | DNA Replication." Available from <http://mhanswers-auth.mhhe.com/sciences/life-science/genetics/mcgraw-hill-answers-dna-replication#other-replication-structures:-the-d-loop-model>
- Johnson, M. 2013. "Protein Quantitation." *Labome Materials and Methods*. Available from <http://www.labome.com/method/Protein-Quantitation.html>
- Jones, A. W., Z. Yao, J. M. Vicencio, A. Karkucinska-Wieckowska, and G. Szabadkai. 2012. "PGC-1 family coactivators and cell fate: roles in cancer, neurodegeneration, cardiovascular disease and retrograde mitochondria-nucleus signalling." *Mitochondrion* no. 12 (1):86-99. doi: 10.1016/j.mito.2011.09.009.
- Justo, R., M. P. Alcolea, B. Colom, A. N. Riera, M. Gianotti, and F. J. Garcia-Palmer. 2002. "Morphofunctional changes in the mitochondrial subpopulations of conceptus tissues during the placentation process." *Cell Mol Life Sci* no. 59 (12):2199-209.
- Justo, R., J. Boada, M. Frontera, J. Oliver, J. Bermudez, and M. Gianotti. 2005. "Gender dimorphism in rat liver mitochondrial oxidative metabolism and biogenesis." *Am J Physiol Cell Physiol* no. 289 (2):C372-8. doi: 10.1152/ajpcell.00035.2005.
- Justo López, R. 2006. "Función y biogénesis mitocondrial. Diferencias entre géneros." *TDX (Tesis Doctorals en Xarxa)*. doi: <http://hdl.handle.net/10803/9380>.
- Kahn, B. B., and J. S. Flier. 2000. "Obesity and insulin resistance." *J Clin Invest* no. 106 (4):473-81. doi: 10.1172/jci10842.
- Kimura, S., G. X. Zhang, A. Nishiyama, T. Shokoji, L. Yao, Y. Y. Fan, M. Rahman, T. Suzuki, H. Maeta, and Y. Abe. 2005. "Role of NAD(P)H oxidase- and mitochondria-derived reactive oxygen species in cardioprotection of ischemic reperfusion injury by angiotensin II." *Hypertension* no. 45 (5):860-6. doi: 10.1161/01.HYP.0000163462.98381.7f.
- Koene, S., and Smeitink, J. 2009. "Mitochondrial medicine: entering the era of treatment." *J Intern Med* no. 265 (2):193-209. doi: 10.1111/j.1365-2796.2008.02058.x.
- Lagouge, M., C. Argmann, Z. Gerhart-Hines, H. Meziane, C. Lerin, F. Daussin, N. Messadeq, J. Milne, P. Lambert, P. Elliott, B. Geny, M. Laakso, P. Puigserver, and J. Auwerx. 2006. "Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha." *Cell* no. 127 (6):1109-22. doi: 10.1016/j.cell.2006.11.013.
- Lin, J., P. Puigserver, J. Donovan, P. Tarr, and B. M. Spiegelman. 2002. "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1beta (PGC-1beta), a novel PGC-1-related transcription coactivator associated with host cell factor." *J Biol Chem* no. 277 (3):1645-8. doi: 10.1074/jbc.C100631200.
- Lu, Y., L. Qian, Q. Zhang, B. Chen, L. Gui, D. Huang, G. Chen, and L. Chen. 2013. "Palmitate induces apoptosis in mouse aortic endothelial cells and endothelial." *Life Sci* no. 92 (24-26):1165-73. doi: 10.1016/j.lfs.2013.05.002.
- Maldonado, H. 2010. "SDS-PAGE Western Blot, Ingeniería genética." *FBMC (Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular)*. Available from <http://www.fbmc.fcen.uba.ar/materias/ingen/practicos/proteinas/clases/SDS-PAGE%20Western%20Blot.pdf>.
- Maniura-Weber, K., S. Goffart, H. L. Garstka, J. Montoya, and R. J. Wiesner. 2004. "Transient overexpression of mitochondrial transcription factor A (TFAM) is sufficient to stimulate mitochondrial DNA transcription, but not sufficient to increase mtDNA copy number in cultured cells." *Nucleic Acids Res* no. 32 (20):6015-27. doi: 10.1093/nar/gkh921.
- Miura, H., J. J. Bosnjak, G. Ning, T. Saito, M. Miura, and D. D. Gutterman. 2003. "Role for hydrogen peroxide in flow-induced dilation of human coronary arterioles." *Circ Res* no. 92 (2):e31-40.
- Montoya, J. 2005. "Biogénesis y Patología Mitocondrial." *Rev. Real Academia de Ciencias. Zaragoza* 60:7-28. Available from <http://www.unizar.es/acz/05Publicaciones/Revistas/Revista60/007.pdf>
- Nadal-Casellas, A., E. Amengual-Cladera, A. M. Proenza, I. Llado, and M. Gianotti. 2010. "Long-term high-fat-diet feeding impairs mitochondrial biogenesis in liver of male and female rats." *Cell Physiol Biochem* no. 26 (3):291-302. doi: 10.1159/000320552.
- Nadal-Casellas, A., M. Bauza-Thorbrugge, A. M. Proenza, M. Gianotti, and I. Llado. 2013. "Sex-dependent differences in rat brown adipose tissue mitochondrial biogenesis and insulin signaling parameters in response to an obesogenic diet." *Mol Cell Biochem* no. 373 (1-2):125-35. doi: 10.1007/s11010-012-1481-x.
- Nadal-Casellas, A., A. M. Proenza, M. Gianotti, and I. Llad. 2011. "Brown adipose tissue redox status in response to dietary-induced obesity-associated oxidative stress in male and female rats." *Stress* no. 14 (2):174-84. doi: 10.3109/10253890.2010.524681.
- National Diagnostics. 2011. "Fundamentals of Electrophoresis. Multiphasic Buffer Systems." Available from <https://www.nationaldiagnostics.com/electrophoresis/article/multiphasic-buffer-systems>
- O'Neill, H. M., G. P. Holloway, and G. R. Steinberg. 2013. "AMPK regulation of fatty acid metabolism and mitochondrial biogenesis: implications for obesity." *Mol Cell Endocrinol* no. 366 (2):135-51. doi: 10.1016/j.mce.2012.06.019.
- OpenWetWare. 2009. "RNA extraction using trizol/tri." Available from [http://openwetware.org/wiki/RNA\\_extraction\\_using\\_trizol/tri](http://openwetware.org/wiki/RNA_extraction_using_trizol/tri).
- Puddu, P., G. M. Puddu, L. Galletti, E. Cravero, and A. Muscari. 2005. "Mitochondrial dysfunction as an initiating event in atherogenesis: a plausible hypothesis." *Cardiology* no. 103 (3):137-41. doi: 10.1159/000083440.

- Puigserver, P., and Spiegelman, BM. 2003. "Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator." *Endocr Rev* no. 24 (1):78-90.
- Rubio González, T. and Verdecia Jarque, M. 2004. "Las enfermedades mitocondriales: un reto para las ciencias médicas." *MEDISAN* 8(1):43-50 2004. Available from [http://www.bvs.sld.cu/revistas/san/vol8\\_n1\\_04/san08104.pdf](http://www.bvs.sld.cu/revistas/san/vol8_n1_04/san08104.pdf).
- Samuel, V. T., Z. X. Liu, X. Qu, B. D. Elder, S. Bilz, D. Befroy, A. J. Romanelli, and G. I. Shulman. 2004. "Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease." *J Biol Chem* no. 279 (31):32345-53. doi: 10.1074/jbc.M313478200.
- Scarpulla, R. C. 2002. "Transcriptional activators and coactivators in the nuclear control of mitochondrial function in mammalian cells." *Gene* no. 286 (1):81-9.
- Scarpulla, R. C. 2008. "Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function." *Physiol Rev* no. 88 (2):611-38. doi: 10.1152/physrev.00025.2007.
- Scarpulla, R. C. 2011. "Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network." *Biochim Biophys Acta* no. 1813 (7):1269-78. doi: 10.1016/j.bbamcr.2010.09.019.
- Scarpulla, R. C., R. B. Vega, and D. P. Kelly. 2012. "Transcriptional integration of mitochondrial biogenesis." *Trends Endocrinol Metab* no. 23 (9):459-66. doi: 10.1016/j.tem.2012.06.006.
- Schwer, B., and E. Verdin. 2008. "Conserved metabolic regulatory functions of sirtuins." *Cell Metab* no. 7 (2):104-12. doi: 10.1016/j.cmet.2007.11.006.
- Sclafani, A., and D. Springer. 1976. "Dietary obesity in adult rats: similarities to hypothalamic and human obesity syndromes." *Physiol Behav* no. 17 (3):461-71.
- Sowash, John R. 2009. "Dissection of the Rat." Available from <http://jrsowash.wikispaces.com/file/view/rat.student.pdf>.
- Sparks, L. M., H. Xie, R. A. Koza, R. Mynatt, M. W. Hulver, G. A. Bray, and S. R. Smith. 2005. "A high-fat diet coordinately downregulates genes required for mitochondrial oxidative phosphorylation in skeletal muscle." *Diabetes* no. 54 (7):1926-33.
- Stojanovski, D., Johnston, AJ., Streimann, I., Hoogenraad, NJ. and Ryan, MT. 2003. "Import of nuclear-encoded proteins into mitochondria." *Exp Physiol* no. 88 (1):57-64.
- Suliman, H. B., M. S. Carraway, K. E. Welty-Wolf, A. R. Whorton, and C. A. Piantadosi. 2003. "Lipopolysaccharide stimulates mitochondrial biogenesis via activation of nuclear respiratory factor-1." *J Biol Chem* no. 278 (42):41510-8. doi: 10.1074/jbc.M304719200.
- Tabit, C. E., W. B. Chung, N. M. Hamburg, and J. A. Vita. 2010. "Endothelial dysfunction in diabetes mellitus: molecular mechanisms and clinical implications." *Rev Endocr Metab Disord* no. 11 (1):61-74. doi: 10.1007/s11154-010-9134-4.
- Turner, N., C. R. Bruce, S. M. Beale, K. L. Hoehn, T. So, M. S. Rolph, and G. J. Cooney. 2007. "Excess lipid availability increases mitochondrial fatty acid oxidative capacity in muscle: evidence against a role for reduced fatty acid oxidation in lipid-induced insulin resistance in rodents." *Diabetes* no. 56 (8):2085-92. doi: 10.2337/db07-0093.
- Valerio, A., A. Cardile, V. Cozzi, R. Bracale, L. Tedesco, A. Pisconti, L. Palomba, O. Cantoni, E. Clementi, S. Moncada, M. O. Carruba, and E. Nisoli. 2006. "TNF-alpha downregulates eNOS expression and mitochondrial biogenesis in fat and muscle of obese rodents." *J Clin Invest* no. 116 (10):2791-8. doi: 10.1172/jci28570.
- Valle, I., A. Alvarez-Barrientos, E. Arza, S. Lamas, and M. Monsalve. 2005. "PGC-1alpha regulates the mitochondrial antioxidant defense system in vascular endothelial cells." *Cardiovasc Res* no. 66 (3):562-73. doi: 10.1016/j.cardiores.2005.01.026.
- Valle, A., R. Guevara, F. J. Garcia-Palmer, P. Roca, and J. Oliver. 2007. "Sexual dimorphism in liver mitochondrial oxidative capacity is conserved under caloric restriction conditions." *Am J Physiol Cell Physiol* no. 293 (4):C1302-8. doi: 10.1152/ajpcell.00203.2007.
- Ventura-Clapier, R., Garnier, A. and Veksler, V. 2008. "Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1alpha." *Cardiovasc Res* no. 79 (2):208-17. doi: 10.1093/cvr/cvn098.
- Victor, V. M., M. Rocha, R. Herance, and A. Hernandez-Mijares. 2011. "Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in type 2 diabetes." *Curr Pharm Des* no. 17 (36):3947-58.
- Virtue, S., and A. Vidal-Puig. 2010. "Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome--an." *Biochim Biophys Acta* no. 1801 (3):338-49. doi: 10.1016/j.bbali.2009.12.006.
- Waypa, G. B., J. D. Marks, M. M. Mack, C. Boriboun, P. T. Mungai, and P. T. Schumacker. 2002. "Mitochondrial reactive oxygen species trigger calcium increases during hypoxia in pulmonary arterial myocytes." *Circ Res* no. 91 (8):719-26.
- WebMD. 2009. "The Aorta (Human Anatomy): Picture, Function, Location, and Conditions". Available from <http://www.webmd.com/heart/picture-of-the-aorta>.
- Wu, Z., P. Puigserver, U. Andersson, C. Zhang, G. Adelmant, V. Mootha, A. Troy, S. Cinti, B. Lowell, R. C. Scarpulla, and B. M. Spiegelman. 1999. "Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1." *Cell* no. 98 (1):115-24. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80611-x.
- Zhang, D. X., and D. D. Gutterman. 2007. "Mitochondrial reactive oxygen species-mediated signaling in endothelial cells." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* no. 292 (5):H2023-31. doi: 10.1152/ajpheart.01283.2006.

# AGRAÏMENTS

Al Grup d'investigació Metabolisme Energètic i Nutrició (GMEIN), especialment a Marco Bauzá Thorbrügge, Bel M. Galmés Pascual, Miquel Sbert Roig i a la meva tutora, la Dra. Magdalena Gianotti Bauzá, que m'han ajudat, aconsella't i anima't en tot moment.

## ANNEXE

### Abreviatures

**AC:** anticòs

**ADN:** àcid desoxiribonucleic

**ADNmit o ADNmt:** ADN mitocondrial

**AMPK:** 5' AMP-activated protein kinase o 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase. Quinasa activada per monofosfat d'adenosina

**ARN:** àcid ribonucleic

**ARNm:** ARN missatger

**ARNr:** ARN ribosòmic

**ARNt:** ARN de transferència

**ATP:** adenosine-5'-triphosphate. Adenosina-5'-trifosfat, trifosfat d'adenosina, àcid adenosinatrifosfòric o adenosinatrifosfat

**BCA** (mètode conc. proteïnes): bichoninic acid

**B/cAMP:**  $\beta$  adrenergic /Cyclic adenosine monophosphate. Estimulació beta adrenèrgica/ fosfat d'adenosina cíclic

**BSA:** bovine serum albumin. Albúmina de sèrum boví

**CaN:** calcineurina

**CaMKs:** Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinases. Quinasa activada per Ca<sup>2+</sup>/calmodulina

**CDKs:** cyclin-dependent kinases. Quinases dependents de ciclina

**Conc.:** concentració

**CoQ:** coenzim Q

**COX IV:** cytochrome c oxidase subunit IV. subunitat IV de la citocrom c oxidasa

**CRM:** cadena respiratòria mitocondrial

**Cyt c:** cytochrome complex. Citocrom c

**CVD:** cardiovascular diseases. Malalties cardiovasculars

**DM2:** diabetes mellitus tipus 2

**EDTA:** ethylenediaminetetraacetic acid. Àcid etilendiamintetraacètic

**EGTA:** ethylene glycol tetraacetic acid. Àcid etilenglicoltetraacètic

**ERRs:** estrogen-related receptor. Receptors relacionats amb estrògens

**ERR $\alpha$ :** receptors associats a estrògens alfa

**ERR $\gamma$ :** receptors associats a estrògens gamma

**FADH<sub>2</sub>:** flavin adenine dinucleotide. Dinucleòtid de flavina i adenina o flavina adenina dinucleòtid (estat reduït)

**FAO:** fatty acid transport and oxidation. Transport i oxidació d'àcids grassos

**HFD:** high fat diet. Dieta rica en greixos

**HMG:** high mobility group. Proteïnes d'alta mobilitat

**HRP:** horseradish peroxidase. Peroxidasa de rave

**IL-6:** interleucina 6

**MCP-1:** monocyte chemoattractant protein 1. Proteïna quimiotàctica de monòcits 1

**mTERF:** Mitochondrial transcription termination factor. Factor de terminació de la transcripció mitocondrial

**mtRNApol= POLRMT:** polymerase (RNA) mitochondrial. ARN polimerasa mitocondrial

**NADH:** nicotinamide adenine dinucleotide. Nicotinamida adenina dinucleòtid (estat reduït)





**NOS/cGMP:** nitric oxide synthases / cyclic guanosine monophosphat. Òxid nítric sintasa/ fosfat de guanosina cíclic

**NRFs:** nuclear respiratory factors. Factors respiratoris nuclears

**NS:** no significant

**O<sub>H</sub>:** origen de replicació de la cadena pesada (heavy)

**O<sub>L</sub>:** origen de replicació de la cadena lleugera (light)

**o/n:** Overnight

**OXPHOS:** Oxidative phosphorylation. Fosforilació oxidativa

**p38MAPK:** P38 mitogen-activated protein kinases. Proteïna quinasa activada per p38

**pI:** punt isoelectric

**PRC:** coactivador relacionat amb PGC (peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator)

**PGC1 $\alpha$ :** peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1-alpha. Coactivador 1-alfa de receptors gamma activats per proliferadors de peroxisomes

**PGC1 $\beta$ :** peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1-beta. Coactivador 1-beta de receptors gamma activats per proliferadors de peroxisomes

**PM:** pes molecular

**PPARs:** peroxisome proliferator-activated receptor. Receptors activats per proliferadors de peroxisomes

**PSA:** persulfat d'amoni o persulfat amònic

**RI:** resistència a la insulina

**RNasa:** ribonucleasa

**RNasa MRP:** ribonuclease mitochondrial RNA processing complex. Ribonucleasa mitocondrial

**ROS:** reactive oxygen species. Espècies reactives d'oxigen

**SDS:** sodium dodecyl sulfate. Dodecilsulfat sòdic

**SDS-PAGE:** sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. Electroforesi en gel de poliacrilamida amb dodecilsulfat sòdic

**SIRT:** sirtuïnes

**STE (tampó):** Sodium Chloride-Tris-EDTA

**TAB:** teixit adipós blanc

**TAM:** teixit adipós marró

**TBS:** Tris-Buffered Saline

**TBS-T:** TBS I Tween 20

**TEMED:** Tetrametiletilendiamina

**TFAM = mtTFA:** mitochondrial transcription factor A. Factor de transcripció mitocondrial A

**TFB1M:** transcription factor B 1, mitochondrial o Dimethyladenosine transferase 1 mitochondrial. Factor de transcripció B1 mitocondrial

**TFB2M:** transcription factor B 2, mitochondrial o Dimethyladenosine transferase 2, mitochondrial. Factor de transcripció B2 mitocondrial

**TG:** triglicèrids

**TH:** thyroid hormones. Hormones tiroïdes

**TIM:** translocase of the inner membrane. Translocasa de la membrana interna

**TNF $\alpha$ :** tumor necrosis factor- $\alpha$ . Factor de necrosi tumoral  $\alpha$

**TOM:** translocase of the outer membrane. Translocasa de la membrana externa

**Tris:** Tris (hydroxymethyl) aminomethane. Tris (hidroximetil) aminometà

**UA:** unitats arbitràries

**UCPs:** uncoupling proteins. Proteïnes desacobladores

**WB:** western-blot

