

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA



**APLICACIÓN DE TÉCNICAS PROTEÓMICAS DE ALTA
RESOLUCIÓN AL ESTUDIO DE LA OBESIDAD Y LA
DIABETES TIPO 2: ANÁLISIS DE LA DISFUNCIÓN
MITOCONDRIAL EN EL TEJIDO ADIPOSO HUMANO**

María Gómez Serrano

Madrid 2017

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

**APLICACIÓN DE TÉCNICAS PROTEÓMICAS DE ALTA
RESOLUCIÓN AL ESTUDIO DE LA OBESIDAD Y LA
DIABETES TIPO 2: ANÁLISIS DE LA DISFUNCIÓN
MITOCONDRIAL EN EL TEJIDO ADIPOSO HUMANO**

María Gómez Serrano
Licenciada en Biología

Directora de Tesis:
Dra. M^a Belén Peral Fuentes, Investigador Científico del Consejo Superior de
Investigaciones Científicas (CSIC)

Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UAM
Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” (CSIC-UAM)
Madrid

María Belén Peral Fuentes, Investigador Científico del Consejo Superior de Investigaciones Científicas en el Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” de Madrid,

CERTIFICA que

Doña María Gómez Serrano, Licenciada en Biología por la Universidad de Alcalá (Madrid) ha realizado bajo su dirección el trabajo de investigación titulado:

“Aplicación de técnicas proteómicas de alta resolución al estudio de la obesidad y la diabetes tipo 2: análisis de la disfunción mitocondrial en el tejido adiposo humano”

y considera que el trabajo realizado reúne todas las condiciones requeridas por la legislación vigente, así como la originalidad y calidad científica necesarias, para poder ser presentado y defendido con el fin de optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que así conste y surjan los efectos oportunos, firman el presente certificado en Madrid a 31 de marzo de 2017.

Firma Directora de la Tesis Doctoral
Dra. María Belén Peral Fuentes
Investigador Científico del CSIC

Vº Bº Tutor de la Tesis Doctoral
Dra. Ángela María Martínez Valverde
Investigador Científico del CSIC

Este trabajo ha podido realizarse gracias una beca predoctoral del Programa de Formación del Personal Investigador de la Universidad Autónoma de Madrid (FPI-UAM) y a la financiación del proyecto SAF2012-33014 del Plan Nacional de I+D+i (Ministerio de Economía y Competitividad)

“Soy de las que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su laboratorio no es solo un técnico: es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas.”

Maria Salomea Skłodowska-Curie (1867 - 1934)

agradecimientos.

*“Mientras el río corra, los montes hagan sombra y en el cielo haya estrellas,
debe durar la memoria del beneficio recibido en la mente del hombre agradecido”*

Virgilio, Publius Vergilius Maro (70 a.C. - 19 a.C.)

Quien me conozca sabe que no soy, precisamente, mujer de pocas palabras. Aun así, intentaré condensar en estas líneas la profunda emoción que me invade ahora que se cierra una de las mejores etapas de mi vida.

En primer lugar, me gustaría agradecer a la **Dra. Peral** la oportunidad que me brindó al poder formar parte de su laboratorio. Sin ella, y la confianza que depositó en mí desde el primer momento, nada de esto hubiera sido posible. ¡Ay Belén, cuántas cosas han pasado desde que llegué al IIB! ¡Cuántas reuniones en el despacho, cuántas operaciones, cuántas preocupaciones, cuántas celebraciones...! Gracias por otorgarme tanta libertad en el laboratorio; sin duda, todo ello ha contribuido enormemente a mi formación como investigadora. En esta última etapa hemos estado quizás más juntas que nunca (con todo lo que eso conlleva) y ha sido un placer compartir los buenos momentos de poyata (¡y la extracción de mitocondrias!) contigo. Por no mencionar los momentos de *submission* (creo que si me acuerdo me sigue entrando un ataque de risa). Gracias por comportarte como una tercera madre en muchas ocasiones y por todo lo que me has ayudado. De paso, me gustaría agradecer a Alba que a estas alturas no me odie. Me imagino lo “fácil” que habrá sido el día a día después del *lab* cuando la hayas contado “las mil y una cosas que ha hecho María”. Espero que siga tan estudiosa y brillante el resto de su vida.

En segundo lugar, me gustaría agradecer la inmensa colaboración que hemos recibido por parte de la **Dra. Inés García-Consuegra** y los **equipos clínicos de los hospitales Gregorio Marañón y Clínico San Carlos de Madrid**. Sin ellos, hubiera sido imposible realizar este trabajo. Me gustaría hacer una especial mención a los Dres. Antonio Torres, Andrés Sánchez-Pernaute y Miguel Ángel Rubio, y como no, a mi querido **Jesús Lago**. Si esta Tesis tiene un comienzo, se debe a la simpatía del Dr. Lago y su afán investigador contagioso que hizo que nos pusiéramos en contacto con él. Por descontado, no puedo dejar de dar las gracias a todos y cada uno de los pacientes implicados en esta Tesis Doctoral. Posiblemente nunca sepan lo importantes que han sido para mí.

En tercer lugar, debo agradecer al **Dr. Jesús Vázquez** (de la **Unidad Proteómica del CNIC**) la confianza que siempre ha depositado en nuestro proyecto. Gracias por darme la oportunidad de integrarme en tu equipo durante casi un año y medio. Y gracias a todos sus miembros por hacerme sentir una más mientras estuve allí (y cuando ya no estuve, acordándose de mí en las fiestas de Navidad), y por ayudarme a lidiar con el QuiXot, el SanXot, el SanSon-ghost... Gracias Marta, Fer, Inma, Clara, Aleks, Estefi, Navratán, Marco, Iakes, Elena...por las cañas compartidas, pero sobre todo gracias **Raquel** por convertirme en “la Mery” y ayudarme en todo lo que estuviera en tu mano; gracias **Juan Antonio** por todos tus consejos, correcciones, explicaciones y esa voz amiga mientras me pegaba con la Biología de Sistemas; y como no, gracias **Emilio**. Gracias como tantas veces te he dicho en todos y cada uno de los *mails*, gracias por dedicarme tu tiempo y enseñarme lo (poquito) que sé acerca de la Proteómica, por contagiar tu entusiasmo y optimismo hacia la vida y sobre todo gracias por tu ayuda desinteresada y hacer de auténtico “co-director en la sombra”.

También quisiera dar las gracias al **Dr. Fernández-Real** por permitirme realizar mi primera estancia y aproximación al mundo de la genómica. Gracias a todos los que allí me ayudasteis, en especial a José y a Paco, quienes se volcaron conmigo y por enseñarme. Gracias Paco por conseguir que me sintiera toda una científica cuando solo contaba con 2 meses de pre-doc.

Después me gustaría comenzar dando las gracias a todos mis compañeros que ya no están, porque ellos consiguieron que me enamorara del IIB, de su gente y que quisiera quedarme allí. Gracias **Pepa** por enseñarme que no hay controles suficientes en el mundo y gracias **Zambrano** por tus consejos sobre cultivos celulares y sobre ciencia en general. Gracias Ale, Dani, Toni, Blanca, Miri, Cris, Álvaro...y todos los integrantes de las **falconadas**. En especial, gracias **Mario** por compartir conmigo tantos buenos momentos, confidencias y fiestas. Gracias por enseñarme que hay que crecerse ante la adversidad, y tomarse una caña como gasolina. Sabes que has sido, eres y serás mi canario favorito. Gracias **Rafa**, porque tú hiciste que el 2.2.2 fuera un laboratorio aún más divertido. Quién te diría que acabarías enseñándome cosas de mitocondrias (precisamente) 7 años después. Gracias por tus palabras de ánimo cuando más las he necesitado. Y por supuesto, **GRACIAS EVA**. Cuantísimo te he echado (y te echo) de menos. Todo lo que sé hacer en la poyata te lo debo a ti. A tu manera de enseñarme, a tu paciencia, a tu delicadeza, a tu (des)organización y a tu cariño. Durante mucho tiempo has sido mi “otro par de manos”, y nunca tendré palabras para agradecértelo.

Intentando mantener un orden, me gustaría empezar con **mis compañer@s del IIB**. Si hay un laboratorio al que estoy profundamente agradecida es al **2.3.1**. Quizás no seáis conscientes de lo mucho que me habéis ayudado en todo este tiempo. Por ello, quisiera empezar dando las gracias a mi amor científico-platónico, el **Dr. Alberto Muñoz**, por su ayuda desinteresada en lo científico y en lo personal: gracias por todas las celebraciones de la Primavera, vecino. Gracias **Chus y Gemma** por aguantar mis quejas, mis anécdotas interminables y mis interrupciones en el *lab*, y gracias por ayudarme en todo lo “tesil” (y en lo concerniente a las fiestas). Gracias **Alba** por ser tan simpática con esa cara pecosa que tienes; ojalá hubieras venido más días a comer con nosotros. Gracias **Asun**, por tantas cosas...gracias por las confidencias, por contribuir a mi belleza exterior con los bonos a pachas, por prohibir hablar de ciencia en la mesa y por echarme una mano con cualquier pregunta científico-técnica (dentro del *lab*): eres una *crack*, en la poyata y fuera de ella. Y mil y una gracias **Toño**. Quería reservarme las últimas líneas del 2.3.1 para agradecerte todo lo que me has ayudado, te has preocupado por mí y sobre todo por todo lo que me has enseñado. Creo que si a día de hoy sé algo de política, de estrategia comercial y de noticias es gracias a ti. Pero si por algo quiero darte las gracias es por ser el ejemplo de la ética científica y profesional. Ojalá hubiera en el mundo más personas como tú: te mereces todo lo bueno que te pase en la vida.

También me gustaría dar las gracias a mis **Sras. Fetén**, en especial a las que me acompañan todos los días a la hora de la comida. Gracias **Mery** por ser como eres (¿por qué no nos conocimos antes?). Eres tan bonita por dentro como por fuera, y a la par, una científica fuera de serie; ojalá todo te salga “fetén”. Gracias **Ali** por estar siempre ahí, por ofrecerme todos los cafés que he necesitado, por apoyarme “al máximo” y por contribuir a las risas que hemos echado en todo este tiempo. No querría dejar de dar las gracias al resto de integrantes de la mesa redonda como **Diego** (gracias por tus chistes malos) o **Sol** (gracias por transmitirme tu paz interior).

También me gustaría dar las gracias a mis correpasillos y compañeros de cultivos (porque aunque en esta Tesis no figure ni un 3T3-L1, han sido muchos los días que he pasado cultivándolos). Gracias **Irene** y **Elvira** por ofrecer vuestra alegría y positivismo al mundo. Gracias

Yuri por transmitir esa paz y hacerme sentir menos “pringada” los fines que te he encontrado también en el IIB. Gracias **Bolu** por haber puesto el toque argetino. Gracias **Omar** y **Carla** por vuestra simpatía y vuestra compañía (¡sobre todo en las fiestas!), siempre es genial. Gracias **Olga** por tus consejos y tu ayuda, espero que te vaya genial por “Harvad-cete”.

No podría perdonarme no mencionar a mis **compañeros del 1.9**: José, Marina y Sandra. Gracias por los cafés compartidos, las risas, los abrazos en grupo y la organización de las fiestas. Especialmente en esta última etapa, habéis sido un gran apoyo. Por extensión, me gustaría dar las gracias a la **Dra. Carmen Valenzuela** y a su equipo, porque siempre me he sentido como en una segunda casa. Gracias **Diego** por conseguir que el IIB tenga ese “son” canario tan genial.

También me gustaría dar las gracias a **Laurita** por las confianzas, el apoyo y los piropos.

Gracias **Graci** por los préstamos “ratoniles”; gracias **Raúl** por dejarme usar tu equipo en el momento de “crisis por actividad enzimática” y gracias **Teresa (actual Dra. Galera)** por ofrecerme tu compañía en las prácticas de Bioquímica y tu apoyo y amistad posteriores.

Gracias a mis compis de inglés y en especial a **Brenda**. *Thank you my Dear for all your support, your help and the lovely conversations.* Y gracias a todos los que habéis pasado por el 222; en particular a la **Dra. Liliana Guerra** a la que guardo un cariño especial.

Gracias también a todo el personal de Servicios, en especial a “mi Diegui” y a “mi Carlos”. Gracias **Diego** por tus “buenos días” y tus mails, consigues alegrarnos el día a todos. Gracias **Carlos** por tu forma de ser y por compartir los cafés nocturnos (y cañas y champanes festivaleras) conmigo. Gracias también a **Maty, José y Manolo**, por todos los paquetes de Amazon que me han recogido. Gracias **Charo** por toda la burocrati-ayuda. Y también gracias al personal del Animalario, porque aunque apenas haya tenido contacto con ellos, han ayudado enormemente a hacer ameno el día a día en la Sala de Personal (¡gracias Manu por tus piropos diarios!).

Tampoco querría dejarme **Anuska, Pilar Valdecantos, Ana Jiménez** y **muchos de los “jefes”** que en algún momento me han prestado su ayuda o apoyo científico/personal. Gracias a mi exvecino Ángel Pascual, mi actual vecina Gemma Domínguez, Ana Aranda, María Monsalve, Ana Guadaño, Luis del Peso, Benilde Jiménez, Ángela Valverde, M^a Jesús Obregón y Pilar Santisteban. En definitiva, gracias a todos mis compañeros del IIB y del Dpto. de Bioquímica, porque en algún momento, todos me habéis echado una mano.

Fuera de las paredes del IIB también tengo que dar las gracias a todos aquellos que me han animado a seguir cuando los momentos eran difíciles y el camino se hacía más cuesta arriba. Me gustaría empezar por mi **Uni-verso**, aquellos a los que debo gran parte de mi entusiasmo científico. Gracias Pablo, Patri, Peli, Vir, Alex, Rubén, Jesús, Fran y Alberto. Gracias especialmente al *Hard-core* (y su creador, **Yisus**) donde siempre encuentras la palabra (o caña) necesaria (y el pertinente *back-up* de **Pablo**). Gracias **Peli** por ser como eres y por conseguir que me ría de todo: llenas los sitios donde vas y también llenas mi alma. Gracias **Vir** por tener siempre la palabra exacta, las mejores ideas y los mejores (cuqui-)detalles. Gracias **Patri** porque en la lejanía, has conseguido amenizar mi vida con los cambios de la tuya (debo una gran parte de esto al maravilloso *Facebook*): cuando esté defendiendo esta Tesis, ya tendremos a la pequeña Paula con nosotros. Gracias **Rubén** por permitirme conocer una ciudad estupenda y por compartir tu entusiasmo por la Ciencia conmigo:

eres un fenómeno. Gracias también al recién estrenado **Dr. Majalí-Martínez**, con quien empecé, precisamente, a dar forma a esta memoria: te admiro y te amo, *so guapérrimo*.

Seguidamente, querría dar las gracias a mi confidente, mi consejera, mi mejor amiga: **Teresa**. Bien sabes lo que te admiro y lo que te quiero. Sin duda, nuestros mensajes de voz han sido el empuje que necesitaba por las mañanas (esas tan duras) en las que iba al *lab*. Nunca tendré palabras para agradecer tus consejos y lo que te preocupas por mí, ni tampoco que el último verano te vinieras a comer conmigo al IIB. Ojalá solo te pasen cosas buenas en la vida.

Gracias **David y Nene**, por conseguir que aparque la Ciencia mientras estoy con vosotros: sois la mejor medicina. Y gracias **Vero**, por unirte, y por seguir aquí después de tantos años.

Gracias a todos "**los del Barrio**" por preguntarme cada día qué tal me iba "la Tesis". Gracias a mi *Coñocracia* y mi *Party-Sofá*, sois unos grandes. Particularmente, gracias **Sergi** por conseguir que al final me crea eso de "súper-profe". Y gracias *Sensei* Sergio (y toda la familia del Tsukuri) por ayudarme a descargar mi adrenalina, a desconectar y a ver lo positivo cada día.

También me gustaría dar las gracias a toda **mi familia**, por decirme tantas veces lo "guapa y lista que soy". Quisiera señalar a mis chicas estudiosas, **Laura y Andrea**, por ofrecerme su compañía en CRAI (cuando volví a sentirme joven y con fuerzas otra vez) y a sus queridos amigos, Alba y Roberto, que detoxifican mis neuronas. También a mi *Mr. Policeman*, mi súper primo **Adri**, a quien quiero con locura: gracias por preguntarme "cómo va eso" tantas veces.

Quisiera hacer un hueco especial para **mis abuelos**: cada vez que me miráis con esos ojos, me hacéis sentir la mejor científica del mundo. Y a mis "suegris", **Conchi y Jose**, a quienes no encuentro palabras para agradecer todo lo que hacen por nosotros. Gracias por abrirme un hueco en vuestras vidas: con vosotros, la nuestra es más fácil y feliz.

Gracias a mi **tata** y mi **Chechis** (los *super-cuñaos*), porque habéis sufrido de cerca el día a día, los nervios, las frustraciones (pero también las alegrías, ¡y bien lo hemos celebrado!) Gracias tata por hacerme sentir siempre "la mejor"; gracias por preocuparte por mí y todo lo que me pase y por ofrecerme el mejor hombro del mundo tanto para reír como para llorar. Gracias Chechis por los mails, las recompensas y cuidar lo que más quiero (tan bien).

Y por supuesto gracias a **mis padres**. Se me hace difícil encontrar las palabras correctas para expresar toda la gratitud que siento. Vosotros habéis vivido esto desde el primer momento: con la primera beca, con el primer experimento, con el primer artículo. Gracias por las comidas, las cenas, los *tupper*, las cervezas y las celebraciones improvisadas. Gracias por todos los esfuerzos que habéis hecho y hacéis: conseguís que sienta que no me he equivocado eligiendo esto.

And last, but not least, mi querido **Alberto**. Quizás seas la persona más conocida de todo este texto. Y no es para menos. Contigo empezó esta aventura, el verano de 2010, hace ya 7 años (aunque ahí, aún, no lo sabíamos). No encuentro las palabras para agradecerte la admiración que me procesas, y la que espero que algún día te des cuenta que siento hacia a ti. Lo mucho que me quejo es directamente proporcional a lo que te quiero y te admiro. Siempre me haces sentir fuerte. Gracias por regalarme tu amor, tu tiempo y tu apoyo incondicional. Aunque ahora nos entre vértigo, créeme que lo mejor está por llegar...

resumen_
abstract.

*"El orden y la simplificación son los primeros pasos hacia el dominio de un tema,
el enemigo real es lo desconocido."*

Thomas Mann (1875 - 1925)

La obesidad se considera la nueva pandemia del siglo XXI. La población mundial envejece cada día más y paralelamente las cifras de personas que padecen sobrepeso y obesidad aumentan de forma abrumadora, lo que se traduce en un aumento de la incidencia de patologías como la diabetes tipo 2 (DM2), enfermedad cardiovascular (ECV) o cáncer. La acumulación excesiva de grasa en obesidad conlleva la disfunción del tejido adiposo, lo cual provoca la disrupción de la homeostasis metabólica y el desarrollo de comorbilidades. En los últimos años, la mayoría de abordajes proteómicos que han intentado estudiar la obesidad y sus patologías asociadas han recurrido a modelos animales, limitando las conclusiones de sus estudios. Además, apenas existen referencias en la literatura que hayan utilizado estrategias proteómicas de alta resolución para analizar el tejido adiposo humano.

En esta Tesis Doctoral se describen los cambios sufridos por el proteoma del tejido adiposo visceral de individuos obesos con el envejecimiento y la DM2, así como por el dimorfismo sexual en pacientes diabéticos. Además del análisis de proteínas individuales, en este trabajo se aplican herramientas de Biología de Sistemas para evaluar los cambios del proteoma desde una perspectiva global y dinámica. En el estudio del dimorfismo sexual se encontraron diferencias en el grado de inflamación, la respuesta inmune y la maquinaria antioxidante, así como en la morfología del tejido adiposo. Los estudios de proteómica diferencial de envejecimiento y DM2 mostraron alteraciones en procesos biológicos comunes, como la remodelación de la matriz extracelular o la función mitocondrial, aunque los perfiles proteicos afectados en cada caso fueron distintos.

Debido a la importancia de la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo en el binomio envejecimiento-DM2, también se llevaron a cabo estudios proteómicos para analizar el proteoma mitocondrial de adipocitos aislados del tejido adiposo, así como sus modificaciones oxidativas (proteómica redox). Los cambios en el proteoma mitocondrial confirmaron los resultados encontrados a nivel de tejido adiposo total destacando la alteración de la cadena de transporte electrónico. Mientras que con el envejecimiento se observó una disminución global de los complejos mitocondriales, con la DM2 se encontraron diferencias entre los módulos de los complejos que estaban codificados por el genoma mitocondrial y el nuclear, lo que indicaría posibles defectos en el ensamblaje de los complejos y en el transporte de proteínas a la mitocondria. Además, se demostró por primera vez una relación inversa entre la abundancia de las proteínas y su nivel de oxidación, siendo esta relación más drástica en DM2 que en envejecimiento.

Finalmente, en esta Tesis Doctoral se muestran una serie de estudios funcionales que señalan al complejo IV como nexo de unión entre el envejecimiento y el desarrollo de DM2, dos procesos ligados al estrés oxidativo y a la disfunción mitocondrial.

Obesity has become the new epidemic of the 21st Century. The human population is getting older and the number of overweight and obese people is dramatically increasing. Accordingly, the incidence of such pathologies as type 2 diabetes (T2DM), cardiovascular disease (CVD) and cancer is increasing worldwide. In obesity, excessive accumulation of fat entails adipose tissue dysfunction, which in turn disrupts the metabolic homeostasis with subsequent development of comorbidities. In the last years, most proteomic approaches studying obesity and its associated pathologies have relied on animal models, which has limited the conclusions of their studies. In addition, few references in the literature have applied high-throughput proteomic techniques to the study of human adipose tissue.

This Doctoral Thesis describes the proteome changes undergone by human adipose tissue from obese patients as a consequence of aging and T2DM processes, as well as those changes arising from sexual dimorphism in diabetic patients. Together with the analysis of individual proteins, the application of Systems Biology tools in this work has provided a proteome-wide perspective of these pathologies. The gender-specific hallmarks discovered in diabetic patients were related to the antioxidant machinery, the immune response and the adipose tissue morphology. Both the aging and T2DM processes were associated with mitochondrial and extracellular matrix remodelling, albeit through well-differentiated proteome changes.

As oxidative stress has been tightly related to mitochondrial dysfunction in both the aging and T2DM processes, we have tackled the impact of these conditions on adipocyte mitochondria from obese patients. For that we have assessed not only the protein abundance changes, but also the dynamic redox modifications undergone by corresponding mitochondrial proteins. Alterations to the mitochondrial proteome revealed specific hallmarks in aging and T2DM, confirming our previous results on total adipose tissue. While a global decrease of oxidative phosphorylation (OXPHOS) subunits was found in aging, diabetic patients exhibited a decrease of specific OXPHOS complexes. In particular, OXPHOS mitochondrial- vs. nuclear-encoded protein modules were found altered in T2DM, suggesting impaired mitochondrial protein translocation and complex assembly. Under both conditions, evidence is shown for the first time of a link between increased thiol protein oxidation and decreased protein abundance in adipose tissue mitochondria, although this association was stronger in T2DM.

Finally, we performed some functional studies on adipocyte mitochondria which highlighted complex IV as a common target connecting the oxidative hallmarks of T2DM and aging progression.

índices .

*"No hay que empezar siempre por la noción primera de las cosas que se estudian,
sino por aquello que puede facilitar el aprendizaje."*

Aristóteles [Ἀριστοτέλης] (384 a.C. - 322 a.C.)

agradecimientos.....	[pág. 11]
resumen_abstract.....	[pág. 17]
índices.....	[pág. 23]
ÍNDICE GENERAL	[pág. 25]
ÍNDICE DE FIGURAS	[pág. 28]
ÍNDICE DE TABLAS	[pág. 30]
abreviaturas.....	[pág. 31]
introducción.....	[pág. 37]
1. TEJIDO ADIPOSO Y OBESIDAD..	[pág. 39]
1.1. El tejido adiposo como órgano endocrino	[pág. 40]
1.1.1. <u>Estructura y composición del tejido adiposo.</u>	[pág. 42]
1.1.2. <u>Localización del tejido adiposo</u>	[pág. 43]
1.1.3. <u>Adipogénesis y expansión del tejido adiposo.</u>	[pág. 45]
1.1.4. <u>Disfunción del tejido adiposo en obesidad.</u>	[pág. 45]
1.2. Epidemiología de la obesidad	[pág. 46]
1.3. Etiología de la obesidad	[pág. 47]
1.3.1. <u>Edad</u>	[pág. 47]
1.3.2. <u>Género</u>	[pág. 48]
1.4. Alteraciones metabólicas en obesidad..	[pág. 48]
1.4.1. <u>Señalización de insulina, IR y desarrollo de DM2</u>	[pág. 48]
2. MITOCONDRIA	[pág. 49]
2.1. (Dis)función mitocondrial	[pág. 49]
2.1.1. <u>El sistema OXPHOS</u>	[pág. 50]
2.1.2. <u>Disfunción mitocondrial y patologías asociadas</u>	[pág. 50]
3. PROTEÓMICA	[pág. 51]
3.1. Bases de la proteómica de alta resolución	[pág. 52]
3.1.1. <u>La metodología iTRAQ</u>	[pág. 53]
3.1.2. <u>Proteómica redox y análisis sistemático de modificaciones oxidativas en</u> <u>residuos de Cys</u>	[pág. 55]
3.2. Aplicación de herramientas de Biología de Sistemas a los análisis proteómicos	[pág. 56]
3.2.1. <u>Concepto de cambios proteicos coordinados</u>	[pág. 56]
3.3. Estudios proteómicos previos en tejido adiposo humano	[pág. 56]
3.4. Estudios proteómicos previos en mitocondria	[pág. 58]
objetivos.....	[pág. 59]
material y métodos.....	[pág. 63]

1. DECLARACIONES ÉTICAS	[pág. 65]
2. DISEÑO Y CONCEPCIÓN DE LOS ESTUDIOS	[pág. 65]
3. MUESTRAS BIOLÓGICAS	[pág. 67]
3.1. Separación de adipocitos y SVF	[pág. 68]
3.2. Aislamiento de mitocondrias	[pág. 69]
3.2.1. <u>Tecnología MACS</u>	[pág. 70]
3.2.2. <u>Protocolo ABCAM</u>	[pág. 70]
4. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA	[pág. 71]
5. ANÁLISIS E IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE TÉCNICAS PROTEÓMICAS DE ALTA RESOLUCIÓN	[pág. 71]
5.1. Extracción de proteínas	[pág. 73]
5.1.1. <u>Muestras del primer estudio (tejido adiposo total)</u>	[pág. 73]
5.1.2. <u>Muestras del segundo estudio (mitocondrias aisladas)</u>	[pág. 73]
5.2. Preparación de la muestra en filtro	[pág. 73]
5.2.1. <u>Muestras de tejido</u>	[pág. 73]
5.2.2. <u>Muestras de mitocondrias: marcaje diferencial de residuos Cys</u>	[pág. 75]
5.3. Digestión en filtro	[pág. 75]
5.4. Marcaje iTRAQ y fraccionamiento peptídico	[pág. 75]
5.5. HPLC y análisis por MS	[pág. 77]
5.6. Búsqueda de espectros de emisión e identificación de péptidos y proteínas ... [pág. 79]	
6. ENSAYOS DE VALIDACIÓN	[pág. 79]
6.1. Separación de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes e inmunodetección (análisis por WB)	[pág. 79]
6.2. Inmunohistoquímica	[pág. 80]
6.2.1. <u>Análisis morfométrico mediante el programa <i>Adiposoft</i></u>	[pág. 82]
6.3. Ensayos de inmunocaptura y actividad enzimática	[pág. 82]
6.4. Análisis de extractos mitocondriales en condiciones nativas	[pág. 83]
6.4.1. <u>Análisis 1D BN-PAGE y 2D BN-SDS/PAGE</u>	[pág. 83]
6.4.2. <u>Ensayos de actividad en gel del complejo I mitocondrial</u>	[pág. 84]
7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	[pág. 84]
7.1. Aplicación del modelo WSPP para la cuantificación de péptidos y proteínas diferencialmente abundantes	[pág. 84]
7.1.1. <u>Análisis de los cambios a nivel de péptido en la estrategia redox</u>	[pág. 85]
7.2. Aplicación del modelo SBT para la búsqueda de cambios proteicos coordinados	[pág. 85]
8. BASES DE DATOS Y OTROS RECURSOS INFORMÁTICOS	[pág. 86]
resultados y discusión.....	[pág. 87]
1. ANÁLISIS DEL PROTEOMA DEL VAT EN OBESIDAD	[pág. 89]
1.1. Identificación del proteoma del VAT y análisis de proteínas individuales diferencialmente abundantes en obesidad	[pág. 90]

1.1.1. <u>Cuantificación de los cambios en la abundancia de proteínas individuales</u>	[pág. 92]
1.1.2. <u>Proteínas alteradas en el estudio de edad</u>	[pág. 95]
1.1.3. <u>Proteínas alteradas en el estudio de DM2</u>	[pág. 97]
1.1.4. <u>Proteínas alteradas en el estudio de género</u>	[pág. 99]
1.2. Búsqueda de cambios proteicos coordinados mediante la aplicación de herramientas de Biología de Sistemas	[pág. 101]
1.2.1. <u>Cambios dinámicos del VAT con el envejecimiento</u>	[pág. 102]
1.2.2. <u>Cambios dinámicos del VAT en función de la DM2</u>	[pág. 107]
1.2.3. <u>Remodelamiento mitocondrial y de la ECM en el VAT con la edad y la DM2</u>	[pág. 111]
1.2.4. <u>Dimorfismo sexual del VAT en DM2</u>	[pág. 114]
2. ANÁLISIS DEL PROTEOMA Y REDOXOMA TIÓLICO MITOCONDRIAL DE LOS ADIPOCITOS	[pág. 121]
2.1. Validación del método	[pág. 121]
2.2. Identificación del proteoma mitocondrial de los adipocitos humanos	[pág. 123]
2.3. Análisis de los cambios en la abundancia de proteínas: identificación de DAPs y cambios proteicos coordinados	[pág. 126]
2.3.1. <u>Cambios dinámicos del proteoma mitocondrial con el envejecimiento</u> ..	[pág. 128]
2.3.2. <u>Cambios dinámicos del proteoma mitocondrial con la DM2</u>	[pág. 132]
2.4. Regulación de los complejos mitocondriales	[pág. 136]
2.4.1. <u>Alteración de los complejos mitocondriales con el envejecimiento</u>	[pág. 136]
2.4.2. <u>Alteración de los complejos mitocondriales en relación a la DM2</u>	[pág. 140]
2.4.3. <u>Hipótesis sobre los defectos en el importe de proteínas mitocondriales como causa subyacente a la disfunción mitocondrial en DM2</u>	[pág. 145]
2.5. Análisis del redoxoma tiólico mitocondrial	[pág. 146]
2.5.1. <u>Cuantificación de los niveles de oxidación en el proteoma mitocondrial: diferencias asociadas a la edad y a la DM2</u>	[pág. 146]
2.5.2. <u>Relación entre el grado de oxidación y la abundancia de las proteínas</u>	[pág. 149]
2.6. Estudio funcional de la mitocondria de adipocitos humanos: diferencias asociadas a la DM2	[pág. 152]
3. REFLEXIONES FINALES	[pág. 155]
conclusiones.....	[pág. 157]
referencias.....	[pág. 161]
anexo-I_tablas suplementarias.....	[pág. 191]
anexo-II_publicaciones.....	[pág. 199]

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Estructura y composición del tejido adiposo.....	[pág. 43]
Figura 2 Teoría de la expandabilidad y papel del VAT en el desarrollo de comorbilidades.....	[pág. 44]
Figura 3 Esquema del sistema OXPHOS.....	[pág. 50]
Figura 4 Identificación de proteínas mediante LC-MS.....	[pág. 52]
Figura 5 Bases de la metodología iTRAQ.....	[pág. 54]
Figura 6 Visualización del concepto de cambios coordinados y su importancia en estudios biológicos.....	[pág. 57]
Figura 7 Pacientes reclutados y esquema de los estudios comparativos abordados en esta Tesis Doctoral.....	[pág. 66]
Figura 8 Procesamiento de tejido adiposo fresco para la separación de adipocitos y SVF.....	[pág. 69]
Figura 9 Abordaje experimental en el análisis proteómico del VAT.....	[pág. 72]
Figura 10 Abordaje experimental en el análisis proteómico de las mitocondrias aisladas de los adipocitos.....	[pág. 74]
Figura 11 Cromatogramas de las muestras de digestión.....	[pág. 76]
Figura 12 Análisis HPLC en los estudios proteómicos.....	[pág. 78]
Figura 13 Cobertura del proteoma del VAT.....	[pág. 90]
Figura 14 Funciones destacadas en el proteoma del VAT de pacientes obesos.....	[pág. 91]
Figura 15 Flujo de trabajo (<i>workflow</i>) seguido en el análisis del proteoma del VAT.....	[pág. 93]
Figura 16 Distribución normal de los datos de cuantificación del proteoma del VAT.....	[pág. 93]
Figura 17 Cambios en la abundancia de proteínas individuales en el VAT de pacientes obesos.....	[pág. 94]
Figura 18 Validación de DAPs mediante WB en el estudio diferencial de edad del VAT.....	[pág. 95]
Figura 19 Validación de la proteína TOM22 como DAP en el estudio diferencial de edad mediante IHC.....	[pág. 97]
Figura 20 Validación de DAPs mediante WB en el estudio diferencial de DM2 del VAT.....	[pág. 98]
Figura 21 Validación de DAPs mediante WB en el estudio diferencial de género del VAT.....	[pág. 101]
Figura 22 Cambios proteicos coordinados en el VAT de pacientes obesos con la edad.....	[pág. 102]
Figura 23 Evaluación de la celularidad del VAT en función de la edad.....	[pág. 106]
Figura 24 Cambios proteicos coordinados en el VAT de pacientes obesos en relación a la DM2.....	[pág. 107]
Figura 25 Evaluación de la celularidad del VAT en relación a la DM2.....	[pág. 111]
Figura 26 Análisis de la red de interacciones de las proteínas mitocondriales del VAT disminuidas coordinadamente en los estudios diferenciales de edad y DM2.....	[pág. 112]

Figura 27 Análisis de la red de interacciones de las proteínas de la ECM alteradas coordinadamente en los estudios diferenciales de edad y DM2 del VAT.....	[pág. 114]
Figura 28 Cambios proteicos coordinados en el VAT de pacientes obesos con DM2 en función del género.....	[pág. 115]
Figura 29 Evaluación de la celularidad del VAT en relación al género..	[pág. 119]
Figura 30 Análisis cualitativo de los métodos de aislamiento de mitocondrias empleados en la presente Tesis Doctoral.....	[pág. 122]
Figura 31 Cuantificación del grado de enriquecimiento mitocondrial.....	[pág. 123]
Figura 32 Análisis por microscopía electrónica.....	[pág. 124]
Figura 33 El proteoma mitocondrial de los adipocitos humano..	[pág. 125]
Figura 34 Distribución normal de los datos de cuantificación del proteoma mitocondrial.....	[pág. 128]
Figura 35 Cambios proteicos coordinados en las mitocondrias de pacientes obesos en función de la edad.....	[pág. 129]
Figura 36 Análisis de marcadores OXPHOS para la validación de los cambios coordinados en el proteoma mitocondrial del estudio comparativo de edad.....	[pág. 131]
Figura 37 Cambios proteicos coordinados en las mitocondrias de pacientes obesos asociadas a la DM2.....	[pág. 132]
Figura 38 Validación de SOD2 en el estudio comparativo de DM2.....	[pág. 134]
Figura 39 Análisis de la red de interacciones de las proteínas mitocondriales reguladas en el estudio diferencial de DM2.....	[pág. 135]
Figura 40 Regulación de los complejos mitocondriales con el envejecimiento.....	[pág. 137]
Figura 41 Análisis de los complejos I y IV en el estudio diferencial de edad.....	[pág. 138]
Figura 42 Alteración de las proteínas codificadas por el ADNmt con la edad.....	[pág. 139]
Figura 43 Validación de TFAM en el estudio diferencial de edad.....	[pág. 140]
Figura 44 Regulación de los complejos mitocondriales con la DM2.....	[pág. 141]
Figura 45 Análisis de marcadores OXPHOS y CS en el estudio de DM2.....	[pág. 142]
Figura 46 Análisis de los complejos I y IV en el estudio diferencial de DM2.....	[pág. 143]
Figura 47 Alteración de las proteínas codificadas por el ADNmt en relación a la DM2..	[pág. 144]
Figura 48 Relación de la abundancia de las proteínas y sus niveles de oxidación.....	[pág. 150]
Figura 49 Oxidación de las proteínas OXPHOS.....	[pág. 151]
Figura 50 Función mitocondrial de los adipocitos en relación a la DM2.....	[pág. 153]
Figura 51 Análisis de la actividad del complejo I.....	[pág. 154]

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Principales características del tejido adiposo blanco y marrón.....	[pág. 39]
Tabla 2 Algunas adipoquinas secretadas por el tejido adiposo y sus principales efectos fisiológicos.....	[pág. 41]
Tabla 3 Características clínicas y antropométricas de los pacientes incluidos en los análisis proteómicos....	[pág. 67]
Tabla 4 Fraccionamiento en columna de intercambio catiónico (OASIS MCX) de los péptidos obtenidos.....	[pág. 77]
Tabla 5 Anticuerpos primarios utilizados en los análisis de WB presentados en esta Tesis Doctoral.....	[pág. 81]
Tabla 6 Anticuerpos secundarios utilizados en los análisis de WB presentados en esta Tesis Doctoral.....	[pág. 82]
Tabla 7 Análisis de enriquecimiento funcional de las DAPs que se encontraron exclusivamente en la comparación de edad.....	[pág. 96]
Tabla 8 Análisis de enriquecimiento funcional de las DAPs que se encontraron exclusivamente en la comparación de DM2.....	[pág. 98]
Tabla 9 Análisis de enriquecimiento funcional de las DAPs que se encontraron exclusivamente en la comparación de género.....	[pág. 100]
Tabla 10 Cambios proteicos coordinados en el VAT en función de la edad.....	[pág. 104]
Tabla 11 Cambios proteicos coordinados del VAT en relación a la DM2.....	[pág. 109]
Tabla 12 Cambios proteicos coordinados del VAT en función al género.....	[pág. 116]
Tabla 13 Estudios proteómicos de mitocondrias de adipocitos viscerales humanos.....	[pág. 127]
Tabla 14 Cambios proteicos coordinados en el proteoma mitocondrial en función de la edad.....	[pág. 130]
Tabla 15 Cambios proteicos coordinados en el proteoma mitocondrial en relación a la DM2.....	[pág. 133]
Tabla 16 Péptidos diferencialmente oxidados en las proteínas mitocondriales de adipocitos en función de la edad y de la DM2..	[pág. 147]

abreviaturas.

"Un diccionario es un universo en orden alfabético."

Anatole François Thibault (1844 - 1924)

1D | primera dimensión

2D | segunda dimensión

a.

ADNmt | ADN mitocondrial

ACN | acetónitrilo

ACTB | β -actina

AF | ácido fórmico

AKR1 | aldo-ceto reductasas

ANOVA | análisis de la varianza simple, del inglés *ANalysis Of VAriance*

b.

BCA | ensayo del ácido bicinconínico, del inglés *bicinchoninic acid assay*

BCAAs | aminoácidos de cadena ramificada, del inglés *branched-chain amino acids*

BN-PAGE | electroforesis en gel en condiciones nativas, del inglés *blue native-polyacrylamide gel electrophoresis*

BSA | albúmina de suero bovina, del inglés *bovin serum albumin*

c.

C/EBP β | *CCAAT/enhancer-binding protein*

CANX | calnexina

CLS | estructuras en corona, del inglés *crown like structures*

CNIC | Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares

COL6 | colágeno tipo VI

COX5A | subunidad 5A de la citocromo c oxidasa, del inglés *cytochrome c oxidase subunit 5A*

COX5B | subunidad 5B de la citocromo c oxidasa, del inglés *cytochrome c oxidase subunit 5B*

COX6B1 | subunidad 6B1 de la citocromo c oxidasa, del inglés *cytochrome c oxidase subunit 6B1*

CP | ceruloplasmina

CREB | *cyclic AMP response element-binding protein*

CS | citrato sintasa

CSIC | Consejo Superior de Investigaciones Científicas

CYP27A1 | *mitochondrial sterol-26 hydroxylase*

Cys | cisteína

d.

DAPs | proteínas diferencialmente abundantes, del inglés *differentially abundant proteins*

DE | desviación estándar

DM2 | diabetes tipo 2

DTT | ditioneitol

e.

ECM | matriz extracelular, del inglés *extracellular matrix*

ECL | quimioluminiscencia

ECV | enfermedad cardiovascular

ETC | cadena de transporte electrónico, del inglés *electron transport chain*

f.

FABP4 | proteína transportadora de ácidos grasos 4, del inglés *fatty acid-binding protein 4*

FASP | *Filter-Aided Sample Preparation*

FASN | sintasa de ácidos grasos, del inglés *fatty acid synthase*

FBS | suero fetal bovino, del inglés *fetal bovin serum*

FDR | tasa de error, del inglés *false discovery rate*

FDX1 | adrenoxina

FGF-21 | factor de crecimiento de fibroblastos 21, del inglés *fibroblast growth factor 21*

freeCys | (que contiene) residuos de cisteína sin modificaciones

g.

GAPDH | gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

GELSILOX | *GEL-based Stable Isotope Labeling of OXidized Cys*

GLUT-4 | transportador de glucosa 4, del inglés *glucose transporter type 4*

GO | *Gene Ontology*

GOBPs | procesos biológicos GO

GOCCs | componentes celulares GO

GPX | glutatión peroxidasas

GRP78 | proteína regulada por glucosa de 78 kDa, del inglés *78 kDa glucose-regulated protein*

GST | glutatión S-transferasas

h.

H₂O₂ | peróxido de hidrógeno

HbA1c | hemoglobina glicosilada

HIF-1 α | factor inducible por hipoxia 1 α , del inglés *hypoxia-inducible factor 1 α*

HPLC | cromatografía líquida de alta presión o alta resolución, del inglés *high-pressure or high-performance liquid chromatography*

HRP | peroxidasa de rábano, del inglés *horseradish peroxidase*

HSP70 | proteína de choque térmico 70, del inglés *heat shock protein 70*

i.

IAA | iodoacetamida

ICAT | *isotope-coded affinity tags*

IDH3A | subunidad α de la isocitrato deshidrogenasa, del inglés *isocitrate dehydrogenase subunit alpha*

IHC | inmunohistoquímica

IIB | Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols"

IGA | ensayos de actividad en gel, del inglés *in gel activity assay*

IGF-1 | factor de crecimiento de insulina 1, del inglés *insulin-like growth factor 21*

IL-1 β | interleuquina 1 β

IL-6 | interleuquina 6

IL-10 | interleuquina 10

IMC | índice de masa corporal

IR | resistencia a insulina, del inglés *insulin resistance*

IRDye | fluoróforos de excitación infrarroja

iTRAQ | *isobaric tag for relative and absolute quantification*

l.

LAMB2 | laminina, del inglés *laminin subunit beta-2*

LC | cromatografía líquida, del inglés *liquid chromatography*

m.

m/z | relación masa-carga

MAMs | *mitochondria associated membranes*

MAOA | monoamino oxidasa A

MERC | *trans-2-enoyl-CoA reductase*

MCP-1 | proteína quimioatrayente de monocitos 1, del inglés *monocyte chemotactic protein 1*

MCX | columna de intercambio catiónico

MIA | *Mitochondrial Intermembrane space Assembly pathway*

MMP9 | metaloproteínasa de la matriz 9, del inglés *matrix metalloproteinase-9*

MMTS | metilmetanotiosulfonato

MS | espectrometría de masas, del inglés *mass spectrometry*

MS¹ | ion precursor

MS/MS o MS² | espectro de fragmentación

n .

NDUFA9 | subunidad 9A de la NADH deshidrogenasa, del inglés *NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 9*

nonCys | péptidos/proteínas que no contienen residuos de cisteína

o .

OD | densidad óptica, del inglés

OMS | Organización Mundial de la Salud

ON | toda la noche, del inglés *over-night*

oxCys | (que contiene) residuos de cisteína oxidados

OXPHOS | sistema de fosforilación oxidativa, del inglés *oxidative phosphorylation system*

p .

PAGE | electroforesis en gel de poliacrilamida, del inglés *polyacrilamide-gel electrophoresis*

PBS | tampón fosfato salino, del inglés *phosphate buffer saline*

PDGF- α | factor de crecimiento α derivado de las plaquetas del inglés *platelet-derived growth factor subunit A*

PPAR γ | *peroxisome proliferator-activated receptor- γ*

PTMs | modificaciones postraduccionales, del inglés *post-translational modifications*

r .

RBP4 | proteína de unión a retinol 4 del inglés *retinol-binding protein 4*

RE | retículo endoplásmico

redCys | (que contiene) residuos de cisteína reducidos

redoxCys | (que contiene) residuos de cisteína reducidos y oxidados

RIPA | tampón de ensayo de radioinmunoprecipitación

RNS | especies reactivas del nitrógeno, del inglés *reactive nitrogen species*

ROS | especies reactivas de oxígeno, del inglés *reactive oxygen species*

RT | temperatura ambiente, del inglés *room temperature*

s .

S100A8 | proteína S100 de unión a calcio A8, del inglés *S100 calcium-binding protein A8*

S100A9 | proteína S100 de unión a calcio A9, del inglés *S100 calcium-binding protein A9*

SAOS | síndrome de apnea obstructiva del sueño

SAT | tejido adiposo subcutáneo, del inglés *subcutaneous adipose tissue*

SBT | *Systems Biology Triangle model*

SCs | supercomplejos

SDHC | succinato deshidrogenasa citocromo b560

SLC25A1 | transportador mitocondrial de tricarbóxilato, del inglés *tricarboxylate transport protein, mitochondrial*

SIdI | Servicio Interdepartamental de Investigación

SIL | *marcaje mediante isótopos estables, del inglés stable isotope labeling*

SILAC | *stable isotope labeling with amino acids in cell culture*

SOD | superóxido dismutasas

SOD2 | superóxido dismutasa mitocondrial

SVF | componente estroma-vascular, del inglés *stromal-vascular fraction*

t.

TCA | ciclo de Krebs o ciclo de los ácidos tricarbónicos, del inglés *tricarboxilic acid cycle*

TEAB | tampón trietilamonio bicarbonato

TFA | ácido trifluoroacético

TFAM | factor de transcripción mitocondrial, del inglés *transcription factor A, mitochondrial*

TGF-β | factor de crecimiento transformante β del inglés *transforming growth factor beta*

THBS1 | trombospondina, del inglés *thrombospondin-1*

TIM | translocasas de la membrana mitocondrial interna, del inglés *translocase of inner membrane*

TMT | *tandem mass tag*

TNF-α | factor de necrosis tumoral α, del inglés *tumor necrosis factor α*

TOM | translocasas de la membrana mitocondrial externa, del inglés *translocase of outer membrane*

TOM22 | subunidad de 22 kDa de la translocasa de la membrana mitocondrial externa, del inglés *translocase of outer membrane 22 kDa subunit homolog*

TXN | tiorredoxina

u.

UAM | Universidad Autónoma de Madrid

UCP-1 | proteína desacoplante 1, del inglés *uncoupling protein 1*

USS | tampón de urea, del inglés *urea sample solution*

v.

VAT | tejido adiposo visceral, del inglés *visceral adipose tissue*

VDAC1 | canal de intercambio aniónico dependiente de voltaje 1, del inglés *voltage-dependent anion-selective channel protein 1*

VEGF | factor de crecimiento del endotelio vascular, del inglés *vascular endothelial growth factor*

w.

WB | *Western-blot*

Wq | peso estadístico de la proteína

WSPP | *Weighted Spectrum, Peptide and Protein model*

x.

X'q | \log_2 ratio de la media corregida a nivel de proteína

z.

Zc | \log_2 ratio estandarizada a nivel de categoría funcional

Zp | \log_2 ratio estandarizada a nivel de péptido

Zq | \log_2 ratio estandarizada a nivel de proteína

introducción.

“Si he visto más lejos es porque estoy sentado sobre los hombros de gigantes.”

Isaac Newton (1642 - 1727) a Robert Hooke (1635 - 1703)

Lejos del debate sobre la estética que con frecuencia trae consigo, la obesidad constituye un verdadero problema de Salud Pública. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que cada año mueren aproximadamente 2,8 millones de personas en el mundo a causa de los efectos derivados de la obesidad y el sobrepeso (OMS, Julio 2016). Esencialmente, la obesidad se define como un desequilibrio entre el consumo y el gasto de energía que se traduce en una acumulación excesiva de tejido adiposo con consecuencias perjudiciales en el organismo. A grandes rasgos, esta acumulación excesiva de grasa conlleva a la disfunción del tejido adiposo y, con ello, a la disrupción de la homeostasis metabólica dando lugar al desarrollo de comorbilidades.

El presente trabajo de Tesis Doctoral se centra en el estudio del tejido adiposo humano en obesidad y sus patologías asociadas, más particularmente en la diabetes tipo 2 (DM2), mediante la aplicación de técnicas proteómicas de alta resolución y herramientas de Biología de Sistemas.

1. TEJIDO ADIPOSO Y OBESIDAD

El ser humano posee dos tipos principales de tejido adiposo: el tejido adiposo blanco y el tejido adiposo marrón (también conocido como “grasa parda”). Estos dos tejidos difieren enormemente en sus características moleculares, morfológicas y funcionales, así como en su origen embrionario (**Tabla 1**).

Tabla 1 | Principales características del tejido adiposo blanco y marrón.

	Tejido adiposo blanco	Tejido adiposo marrón
Función principal	Almacenamiento de lípidos en forma de triglicéridos; protección mecánica y aislamiento térmico	Producción de calor (fundamentalmente por la acción de UCP-1)
Localización	Se distinguen dos grandes depósitos: subcutáneo y visceral. Además existen otras localizaciones en la región epicárdica, orbicular o en las gónadas	Pequeños depósitos en el cuello, la región interescapular, paravertebral, axilar y perirenal
Características macroscópicas del tejido	Inervación simpática y parasimpática; vascularización media Alta presencia de otros tipos celulares como linfocitos, macrófagos y fibroblastos	Alta inervación simpática; vascularización elevada Escasa presencia de otros tipos celulares
Tamaño del adipocito	Células grandes (25-200 μm)	Células pequeñas (15-60 μm)
Morfología del adipocito	Fundamentalmente esférica; una gran gota lipídica que desplaza al núcleo y el citoplasma a la periferia Escaso contenido mitocondrial (mitocondrias pequeñas y alargadas)	A menudo tienen un aspecto poliédrico; múltiples gotas lipídicas con un núcleo central Alto contenido mitocondrial que le otorga el color "pardo" (mitocondrias redondeadas y grandes)
Marcadores moleculares principales	Leptina	UCP-1, PGC-1, citocromo c
Origen embrionario	Mesenquimal - Adipoblastos (<i>Pax7-/Myf5-</i>)	Mesenquimal - Mioblastos (<i>Pax7+/Myf5+</i>)

Información adaptada de (Fruhbeck et al, 2009; Rosen & Spiegelman, 2014).

Hasta hace apenas una década, se creía que el tejido adiposo marrón activo estaba presente únicamente en mamíferos con capacidad de hibernación y en neonatos, dada la importancia de su función termogénica (productora de calor) (Hayward & Lisson, 1992). Sin embargo, en el año 2009 se caracterizó la presencia de tejido adiposo marrón funcionalmente activo en adultos (Cypess et al, 2009; Virtanen et al, 2009), dando lugar a una creciente línea de investigación sobre su papel regulador en el metabolismo. De hecho, en los últimos años se ha hablado de un tercer tipo de grasa conocida como tejido adiposo *beige* compuesto por células con gotas lipídicas multiloculares y un número elevado de mitocondrias que están embebidas en el tejido adiposo blanco (Rosen & Spiegelman, 2014). Este tipo de adipocitos procederían de células de tejido adiposo blanco que en un proceso de “pardeamiento” (*browning*) adquirirían características propias del tejido adiposo marrón (principalmente basadas en la capacidad de dispersión de calor tras estimulación β -adrenérgica por la expresión de la proteína desacoplante 1, UCP-1) (Wu et al, 2012) (**Tabla 1**). Aunque aún se debate sobre su origen y las características intrínsecas de los adipocitos *beige* (Rosen & Spiegelman, 2014), se sabe que la acumulación de grasa parda está inversamente relacionada con la edad y el grado de obesidad (Cypess et al, 2009). Esto ha dado lugar a un creciente interés en el campo de la clínica, ya que se ha demostrado que tanto la actividad del tejido adiposo marrón así como el proceso del *browning* del tejido adiposo blanco tienen un papel protector en el metabolismo (Barquissau et al, 2016; Hoeke et al, 2016), lo que potencialmente ayudaría a frenar el desarrollo de comorbilidades.

Por su parte, el tejido adiposo blanco constituye el depósito de grasa principal en el organismo, y ha sido su disfunción en obesidad la que directamente se ha relacionado con el desarrollo de otras patologías como la DM2, enfermedad cardiovascular (ECV) o cáncer (Calle & Thun, 2004; Neeland et al, 2012; Nikolopoulou & Kadoglou, 2012). La presente Tesis Doctoral se enmarca exclusivamente en el estudio del tejido adiposo blanco en obesidad, al que a partir de ahora se referirá como “tejido adiposo” por cuestiones de simplicidad.

1.1. El tejido adiposo como órgano endocrino

Durante años, el tejido adiposo se consideró un mero reservorio de grasa en el organismo. De hecho, en los años 40 se le consideraba una forma de tejido conectivo con capacidad de almacenamiento de grasas en forma de gotas lipídicas y hasta la década de los 80 no se comenzó a reconocer su importante papel en la homeostasis nutricional (Rosen & Spiegelman, 2014). Poco a poco se fueron descubriendo diversas moléculas secretadas por los adipocitos, y fue a partir del año 1994 con el descubrimiento de la leptina (Zhang et al, 1994) cuando se le empezó a considerar un auténtico órgano endocrino. La leptina es la principal hormona secretada por el tejido adiposo y participa en el control del apetito a nivel del sistema nervioso central, la regulación del gasto energético y la señalización de insulina, entre otros (Trayhurn et al, 1999). A día de hoy, la lista de hormonas y factores secretados por el tejido adiposo se ha ampliado enormemente (revisado en (Rodriguez et al, 2015)), lo que remarca la extensión de sus acciones reguladoras (**Tabla 2**).

Tabla 2 | Algunas adipoquinas secretadas por el tejido adiposo y sus principales efectos fisiológicos.

Adipoquina	Respuestas fisiológicas	Referencias
Adiponectina	Hormona con propiedades antidiabéticas, anti-inflamatorias y anti-aterogénicas	(Maeda et al, 2002)
Angiotensinógeno	Incrementa la presión sanguínea y regula la expansión del tejido adiposo	(Massiera et al, 2001)
Calprotectina	Factor pro-inflamatorio implicado en la quimiotaxis y la adhesión celular; actividad anti-microbiana	(Vogl et al, 2007)
FGF-21	Factor estimulante de la captación de glucosa; activador de la termogénesis, el gasto energético y la utilización de lípidos	(Kharitonov et al, 2005)
Grelina	Hormona adipogénica y orexigénica; efecto depresor en la presión arterial (agente cardioprotector)	(Rodriguez et al, 2009)
IGF-1	Estimulación de la proliferación y diferenciación en los adipocitos	(Schmidt et al, 1990)
IL-1β	Citoquina pro-inflamatoria implicada en la inflamación paracrina del tejido adiposo	(Larsen et al, 2007)
IL-6	Citoquina pro-inflamatoria implicada en la respuesta de fase aguda	(Mohamed-Ali et al, 1997)
IL-10	Citoquina anti-inflamatoria	(Kumada et al, 2004)
Leptina	Hormona anorexigénica (inhibidora del apetito); reguladora de la respuesta inflamatoria y la presión arterial además de otros efectos pleiotrópicos	(Fruhbeck et al, 2001; Trayhurn et al, 1999; Zhang et al, 1994)
MCP-1	Proteína quimioatrayente que produce la inflamación e infiltración de macrófagos en el tejido adiposo	(Kanda et al, 2006)
Osteopontina	Factor pro-inflamatorio implicado en el remodelado vascular; citoquina involucrada en el desarrollo de resistencia a insulina y cáncer	(Gomez-Ambrosi et al, 2007)
PDGF-α	Inductor de la activación de células madre del folículo piloso; regulador de la cicatrización de la piel	(Festa et al, 2011; Schmidt & Horsley, 2013)
RBP4	Factor implicado en el desarrollo de la resistencia a insulina, dislipidemia y la acumulación de grasa visceral	(Esteve et al, 2009)
Resistina	Hormona pro-inflamatoria implicada en el desarrollo de la resistencia a insulina	(Banerjee et al, 2004; Stepan et al, 2001)
TGF-β	Factor regulador de la apoptosis y de la proliferación y diferenciación de pre-adipocitos	(Kehrl, 1991)
TNF-α	Citoquina pro-inflamatoria implicada en la inflamación sistémica y el desarrollo de resistencia a insulina	(Hotamisligil et al, 1993)
VEGF	Factor que participa en la estimulación de la angiogénesis en el tejido adiposo	(Gomez-Ambrosi et al, 2010)
Visfatina	Enzima sintetizadora de NAD ⁺ implicada en la regulación de las células β -pancreáticas	(Fukuhara et al, 2005)

FGF-21, factor de crecimiento de fibroblastos 21 ; **IGF-1**, factor de crecimiento de insulina 1; **IL-1 β** , interleuquina 1 β ; **IL-6**, interleuquina 6; **IL-10**, interleuquina 10; **MCP-1**, proteína quimioatrayente de monocitos 1; **PDGF- α** , factor de crecimiento α derivado de las plaquetas; **RBP4**, proteína de unión a retinol 4; **TGF- β** , factor de crecimiento transformante β ; **TNF- α** , factor de necrosis tumoral α ; **VEGF**, factor de crecimiento del endotelio vascular.

Gracias a estas adipoquinas el tejido adiposo posee una importante comunicación con el sistema inmune y otros tejidos. Por ejemplo, el tejido adiposo mantiene una comunicación bidireccional muy importante con el músculo esquelético regulando directamente su sensibilidad a insulina (Hotamisligil et al, 1993; Maeda et al, 2002) y se aprovecha a su vez de la acción de mioquinas con efectos beneficiosos sobre el metabolismo (Bostrom et al, 2012). Además, los adipocitos secretan PDGF- α (factor de crecimiento α derivado de las plaquetas) que favorece la activación de las células madre del folículo piloso (Festa et al, 2011); y la grasa epicárdica produce diversos factores con importantes efectos sobre el sistema cardiovascular (Cherian et al, 2012). Así pues, las acciones del tejido adiposo son variadas y pleiotrópicas, por ello no es de extrañar que su disfunción con la obesidad y la subsecuente alteración de la secreción de estos factores tengan consecuencias sistémicas favoreciendo la aparición de otras patologías.

1.1.1. Estructura y composición del tejido adiposo

Es importante destacar que, además de sus funciones endocrinas, el tejido adiposo también ejerce funciones autocrinas (es decir, se regula a sí mismo) y esto se debe en parte a su composición heterogénea. Aunque la mayoría de adipoquinas son secretadas por los adipocitos (de ahí su nombre), son varias las hormonas que se secretan por otros tipos de células residentes en este tejido (Ouchi et al, 2011). De hecho, el tejido adiposo posee dos fracciones bien diferenciadas: los adipocitos y el componente estroma-vascular (SVF). Los adipocitos forman una estructura tridimensional sustentada en una red de proteínas de matriz extracelular (ECM) entre la que se disponen el resto de componentes del SVF. La composición de la ECM en el tejido adiposo es similar a la que podemos encontrar en otros tejidos y está formada principalmente por proteoglicanos, fibras de colágeno, lamininas y fibronectina, entre otros (Mariman & Wang, 2010). La ECM ejerce un efecto mecánico sobre los adipocitos de manera que las variaciones en su composición y su remodelación ante situaciones de estrés, como en obesidad, desencadenan la disfunción del tejido adiposo (Divoux & Clement, 2011; Mori et al, 2014).

Pese a que la mayor parte del volumen esté ocupado por los adipocitos, el SVF mantiene una importante comunicación con estos y tiene un papel esencial en la regulación del tejido adiposo y su acción endocrina sobre otros tejidos. De hecho, la mayoría de las interleuquinas y moléculas pro-inflamatorias son secretadas por el SVF (Peinado et al, 2010). Los tipos celulares que conforman el SVF son diversos, destacando: células madre mesenquimales (que poseen un gran potencial en terapia celular y medicina regenerativa), pre-adipocitos (o células precursoras de adipocitos), células endoteliales (que forman parte de vasos sanguíneos de distinto calibre), células nerviosas (especialmente fibras aferentes del Sistema Nervioso Simpático), fibroblastos (que tienen una importante función en la formación de la ECM) y diversas células del sistema inmune (como linfocitos y macrófagos) (Frayn et al, 2003) (**Figura 1**). Tal como se desarrollará en apartados siguientes, con la expansión del tejido adiposo en obesidad las poblaciones de células del sistema inmune sufren una grave alteración favoreciéndose la inflamación y el desarrollo de resistencia a insulina (IR) (Ouchi et al, 2011). De entre todas ellas, los

macrófagos destacan por su papel secretor de citoquinas, regulando la sensibilidad a insulina no solo a nivel del tejido adiposo, sino también en músculo e hígado (Xu et al, 2003). Así pues, el SVF contribuye enormemente al perfil secretor del tejido adiposo, llegando a determinar gran parte de las diferencias entre los distintos depósitos de grasa en el organismo (Peinado et al, 2010).

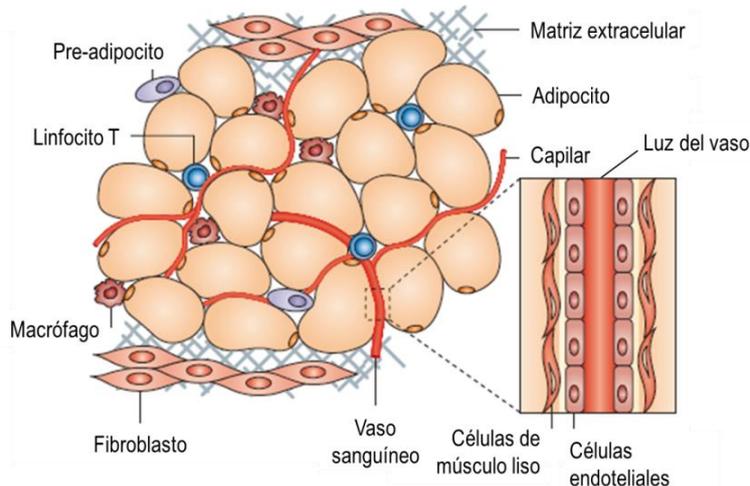


Figura 1 | Estructura y composición del tejido adiposo.

El tejido adiposo tiene una estructura formada por una red tridimensional de adipocitos que se sustenta en una ECM entre la que se disponen el resto de componentes del SVF. Figura modificada de (Ouchi et al, 2011).

1.1.2. Localización del tejido adiposo

El tejido adiposo se encuentra disperso por todo el organismo y, además de la endocrina, ejerce otras funciones como el aislamiento al frío o el soporte mecánico y de protección a los distintos órganos. Se distinguen dos localizaciones principales, **el tejido adiposo visceral (VAT)** y **el tejido adiposo subcutáneo (SAT)**, así como otras localizaciones secundarias alrededor de las rodillas o las vértebras, en la región supra-orbital, en las gónadas o la zona epicárdica. El SAT se encuentra inmediatamente debajo de la piel y se acumula mayoritariamente en la región abdominal, los glúteos y las caderas. El VAT agrupa todos los depósitos de grasa de la cavidad abdominal como son el tejido mesentérico (que rodea al intestino) o el tejido adiposo retroperitoneal (que se encuentra entre las vísceras y la columna vertebral protegiendo a órganos como los riñones), aunque sin duda destaca el tejido adiposo omental, que se extiende como un faldón por delante del aparato digestivo (Wronska & Kmiec, 2012). El SAT posee adipocitos más grandes que el VAT (Tchernof et al, 2006), mayor cantidad de pre-adipocitos (Tchkonina et al, 2005), y sus células madre poseen una mayor capacidad de diferenciación *in vitro* (Walker et al, 2008). El perfil secretor es marcadamente distinto en ambos depósitos, favoreciéndose la liberación de hormonas como la leptina o la adiponectina en el SAT (Drolet et al, 2009; Van Harmelen et al, 1998) y citoquinas pro-inflamatorias en el VAT (Fain et al, 2004). Además, estos tejidos presentan distinto grado de irrigación vascular (Ye, 2011), distinta expresión de receptores para algunas hormonas (Erman et al, 2011; Ortega et al, 2009) y responden de forma distinta a catecolaminas (Hellmer et al, 1992). Este conjunto de diferencias ha dado lugar a que el VAT (representado principalmente por el depósito omental) se le considere la grasa “perjudicial” mientras que al SAT se le atribuya un papel “protector”. De hecho,

diversos estudios poblacionales han señalado que la obesidad central o visceral es la que se asocia al desarrollo de otras patologías, no así la obesidad periférica (Fox et al, 2007; Snijder et al, 2003).

Para encontrar las razones subyacentes a los distintos roles del VAT y el SAT, se han postulado diversas hipótesis. A día de hoy, la más aceptada sostiene que la expandibilidad del SAT es esencial para frenar el desarrollo de comorbilidades (Virtue & Vidal-Puig, 2010). Según esta teoría, la acumulación de grasa se produciría primeramente en el SAT de manera que este se iría expandiendo hasta llegar a un límite (funcionando durante ese tiempo como un “tampón”). Una vez superado ese límite (por ejemplo, en una situación de obesidad), la grasa se localizaría fuera del SAT (dando lugar a la lipotoxicidad) lo que favorecería la aparición de “grasa ectópica” y el desarrollo de comorbilidades. Dentro de esta teoría, el VAT se reconoce como uno de los depósitos ectópicos que marca la disfuncionalidad del SAT y contribuye paralelamente al fomento de la inflamación sistémica y la IR en el organismo (Vidal-Puig, 2013) (Figura 2).

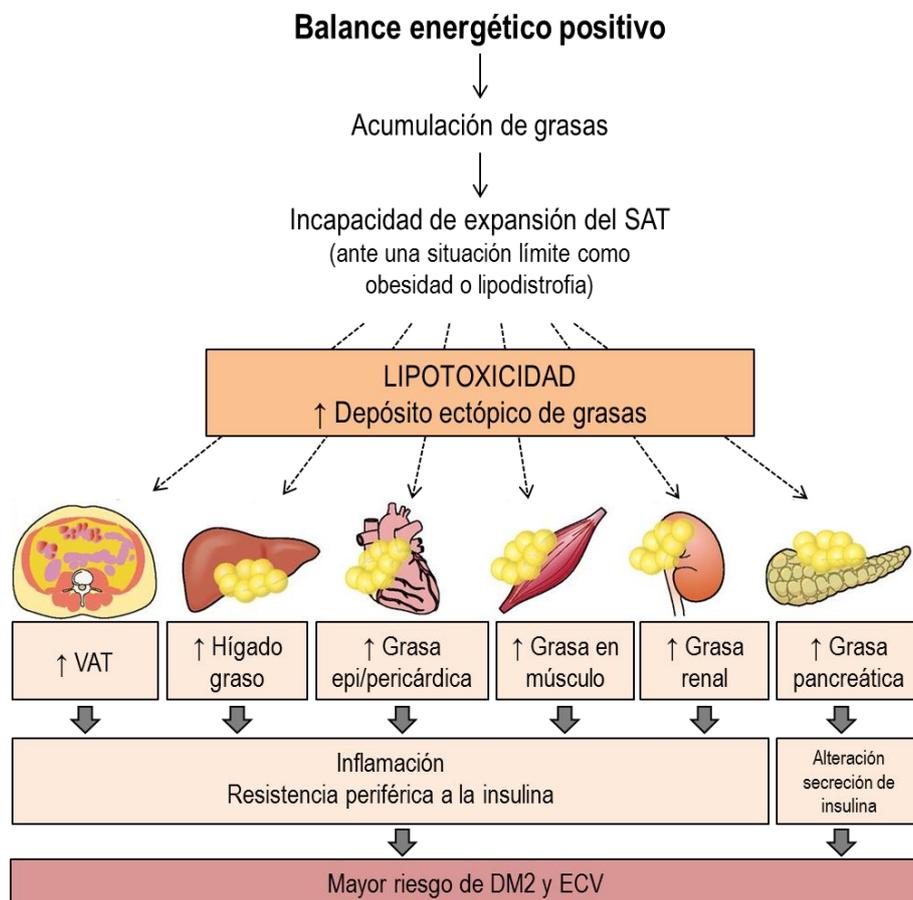


Figura 2 | Teoría de la expandibilidad y papel del VAT en el desarrollo de comorbilidades. Bajo este modelo, el exceso de VAT sería un marcador de disfuncionalidad del SAT. Una vez alcanzado el umbral de expansión, el SAT no sería capaz de almacenar más grasa bajo un estado de balance energético positivo. Esto favorecería la acumulación de grasa ectópica en otros tejidos, con un incremento del riesgo metabólico y cardiovascular. Figura modificada de (Tchernof & Despres, 2013).

1.1.3. Adipogénesis y expansión del tejido adiposo

En un estado de balance energético positivo, el tejido adiposo se expande para acomodar el almacén de exceso de energía en forma de triglicéridos gracias a dos fenómenos: la remodelación de la ECM y la adipogénesis. Estos procesos tienen lugar de forma paralela, de modo que el adipocito contribuye activamente a la remodelación de la ECM durante su proceso de diferenciación (Mariman & Wang, 2010). Es importante subrayar que este remodelamiento se acompaña de la inducción de la angiogénesis (formación de vasos sanguíneos), que es esencial para que al tejido adiposo le lleguen el oxígeno, las hormonas y los componentes nutricionales para su correcta expansión (Cao, 2007).

La adipogénesis es un proceso altamente regulado y complejo en el que se distinguen una serie de pasos críticos: i) reclutamiento de células progenitoras a partir del SVF para que se conviertan en pre-adipocitos; ii) expansión clonal mitótica de los pre-adipocitos e inducción de una cascada de señalización en la que están implicados factores de transcripción como CREB (*cyclic AMP response element-binding protein*), C/EBP β (*CCAAT/enhancer-binding protein*) y PPAR γ (*peroxisome proliferator-activated receptor- γ*); y iii) una etapa final que consiste en la expresión de genes “adipogénicos” que producen el fenotipo propio del adipocito (Brun et al, 1996; Tang & Lane, 2012). Algunos de estos genes son la proteína transportadora de ácidos grasos 4 (FAPB4), el transportador de glucosa 4 (GLUT-4) o la sintasa de ácidos grasos (FASN) (Guo et al, 2015). Así pues, la acumulación de grasa depende fundamentalmente de la formación de nuevos adipocitos (hiperplasia) y el aumento del tamaño de estos adipocitos mediante la acumulación de triglicéridos en su gota lipídica (hipertrofia) (Otto & Lane, 2005).

1.1.4. Disfunción del tejido adiposo en obesidad

La hipertrofia excesiva de los adipocitos forma el eje central de la disfunción del tejido adiposo en obesidad. Para que se produzca una correcta y “sana” expansión del tejido adiposo es fundamental que se produzca un cierto grado de inflamación, lo que a su vez regula la remodelación de la ECM (Wernstedt Asterholm et al, 2014). No obstante, una vez se alcanza el límite en el número de adipocitos que pueden producirse se favorece su hipertrofia excesiva, desembocando en estrés para el adipocito con muerte celular y liberación de lípidos a la circulación que genera **lipotoxicidad** (Gustafson et al, 2009; Vidal-Puig, 2013).

El adipocito hipertrófico posee un perfil de adipoquinas alterado (Ouchi et al, 2011), lo que contribuye a la generación de **inflamación local** (en el tejido adiposo) e **inflamación sistémica** (Hotamisligil, 2006). En el tejido adiposo, la liberación de citoquinas pro-inflamatorias como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) o la interleuquina 6 (IL-6) favorece la lipólisis y disminuye la acumulación de triglicéridos (Stouthard et al, 1995; Xu et al, 1999). Además, la liberación de estas citoquinas al torrente sanguíneo conlleva a que se unan a sus receptores celulares en otros tejidos interfiriendo directamente en la cascada de señalización de insulina y favoreciendo la aparición de IR (Guilherme et al, 2008). Por otro lado, los adipocitos hipertróficos liberan otras citoquinas como MCP-1 (proteína quimioatrayente de

monocitos 1) dando lugar al reclutamiento de macrófagos y otras células del sistema inmune (Sartipy & Loskutoff, 2003). De hecho, en el tejido adiposo de pacientes obesos aparecen una serie de estructuras en corona (*crown like structures*, CLS), que consisten en macrófagos encargados de fagocitar adipocitos necróticos generando focos de inflamación aguda (Cinti et al, 2005). Así, mientras que el tejido adiposo de personas delgadas está fundamentalmente ocupado por linfocitos T reguladores, eosinófilos y macrófagos de tipo M2 (residentes o anti-inflamatorios), en los pacientes obesos las poblaciones inmunes varían manifestando un fenotipo pro-inflamatorio dominado por mastocitos, diversos tipos de linfocitos T y macrófagos M1 (“clásicamente activados” o pro-inflamatorios) (Rosen & Spiegelman, 2014; Sun et al, 2011). Paralelamente, la hipertrofia excesiva de los adipocitos en obesidad impide una adecuada respuesta angiogénica favoreciendo la aparición de focos de **hipoxia** local y contribuyendo a la variación en el perfil secretor de los adipocitos (Sun et al, 2011). El principal regulador de estos efectos es el factor inducible por hipoxia 1 α (HIF-1 α), el cual regula directamente la expresión de genes como la leptina (Lolmede et al, 2003) y la generación de **fibrosis** en el tejido adiposo (Halberg et al, 2009), lo que favorece la aparición de IR.

1.2. Epidemiología de la obesidad

Paradójicamente, el ser humano pasó gran parte del siglo XX luchando contra el hambre en el mundo y sin embargo la obesidad se erige como la nueva epidemia del siglo XXI (NCD-RisC, 2016). Las cifras son claras: desde 1980 la obesidad se ha casi triplicado en todo el mundo; en 2014, el 39% de las personas adultas tenían sobrepeso, y el 13% eran obesas; y a día de hoy, la mayoría de la población mundial vive en países donde el sobrepeso y la obesidad se cobran más vidas que el hambre y la insuficiencia ponderal (OMS, Julio 2016).

Para estimar la adiposidad y el grado de obesidad, se ha recurrido a varios parámetros. El más común es el **índice de masa corporal (IMC)** que establece la relación entre el peso (en kilogramos) y la estatura (en metros cuadrados) de un individuo. La OMS establece que un individuo padece sobrepeso cuando tiene un IMC > 25; que es obeso cuando su IMC > 30 y que padece obesidad mórbida a partir de un IMC de 40. Estudios poblacionales han relacionado el aumento progresivo del IMC con un mayor riesgo de desarrollo de comorbilidades como la hipertensión, dislipidemia, DM2, ECV y cáncer (Calle et al, 2003; Emerging Risk Factors et al, 2011; Willett et al, 1995). Aunque el IMC es una herramienta válida para estimar la prevalencia de la obesidad, este valor posee sus limitaciones ya que no tiene en cuenta la heterogeneidad de la distribución de la grasa en el organismo (Tchernof & Despres, 2013). Por ello, se recurre a otros parámetros como el **perímetro de la cintura** o la **relación cintura/cadera**. Estas medidas permiten estimar el grado de obesidad y determinar la mayor o menor probabilidad que tiene una persona de sufrir enfermedades asociadas (Pouliot et al, 1994; Qiao & Nyamdorj, 2010). Los umbrales por encima de los cuales se incrementa el riesgo de sufrir complicaciones metabólicas para las mujeres son: un perímetro de cintura superior a 80 cm y una relación cintura/cadera por encima de 0,8; y para los

hombres un perímetro de cintura por encima de 94 cm y una relación cintura/cadera por encima de 1,0 (Welborn & Dhaliwal, 2007).

Aunque estas medidas son comúnmente utilizadas en la práctica clínica, actualmente se utilizan otros métodos de imagen para evaluar la composición corporal y la distribución de la grasa *in vivo* como la tomografía computarizada o la resonancia magnética nuclear (revisado en (Goodpaster, 2002)). Otras modalidades más económicas incluyen técnicas como la bioimpedancia eléctrica, que también son válidas para la estimación de la composición corporal (Boneva-Asiova & Boyanov, 2011). Estas tecnologías han permitido incrementar nuestro conocimiento sobre la distribución y composición de la grasa en el organismo llegándose incluso a distinguir entre distintos tipos de obesidad (Yamakado et al, 2012). Estos estudios han confirmado que la acumulación de grasa visceral en detrimento de la subcutánea (con independencia del IMC) determina un peor perfil metabólico y un alto riesgo de desarrollo de comorbilidades (revisado en (Tchernof & Despres, 2013)).

1.3. Etiología de la obesidad

La obesidad es una enfermedad compleja que se produce por un desequilibrio en el consumo y gasto de energía. Las causas que provocan este desequilibrio pueden ser variadas, aunque a menudo la ingesta de alimentos hipercalóricos y la disminución de la actividad física conforman la ecuación de la obesidad. Últimamente se está dando mucha importancia al estudio de la epigenética de la obesidad y su relación con el ambiente y se ha señalado que ya en el vientre materno determinados hábitos pueden incrementar el riesgo de padecer obesidad y DM2 en el futuro adulto (revisado en (Desai et al, 2015)). Otros parámetros que influyen enormemente en la acumulación de grasa son la edad, la etnia, el sexo del individuo y la composición de la microbiota (revisado en (Sommer & Backhed, 2013; Tchernof & Despres, 2013)). En los últimos años, se ha estudiado profundamente el microbioma humano y su alteración en patologías como la obesidad (Spor et al, 2011). Estos trabajos han determinado las especies predominantes en la microbiota intestinal de pacientes delgados frente a obesos y se está discutiendo la posibilidad de realizar trasplantes de microbiota como nuevas terapias anti-obesidad (Brahe et al, 2016; Gupta et al, 2016).

1.3.1. Edad

El envejecimiento se caracteriza por una pérdida progresiva de la integridad fisiológica y un empeoramiento de la funcionalidad celular, lo que se traduce en una mayor vulnerabilidad hacia la muerte (Lopez-Otin et al, 2013). Este deterioro predispone por sí mismo a padecer diversas patologías como el cáncer, la diabetes y desórdenes neurodegenerativos y cardiovasculares. Con la edad, el tejido adiposo se vuelve más fibroso, tiene más tejido conectivo, las paredes vasculares se vuelven más gruesas y disminuye su capacidad de formación de nuevos adipocitos (Divoux et al, 2010; Sun et al, 2011). Además, con el paso del tiempo existe una redistribución anatómica favoreciéndose la acumulación de grasa en el organismo, especialmente en el VAT (Pascot et al, 1999). De hecho, el ratio VAT/SAT

incrementa con el paso del tiempo (Kotani et al, 1994), así como el diámetro de la cintura o la relación cintura/cadera (Han et al, 1997; Shimokata et al, 1989). Es importante recalcar que estas medidas suponen factores de riesgo predictivos para el desarrollo de comorbilidades, de ahí que la obesidad se haya considerado por sí misma un factor acelerador del envejecimiento (Barzilai et al, 2012).

1.3.2. Género

El dimorfismo sexual en obesidad está muy establecido, distinguiéndose incluso dos tipos de fenotipos obesos: un **fenotipo de “pera” o ginoide**, frecuentemente asociado a mujeres, donde destaca la acumulación de SAT frente a VAT y por tanto se asocia a un menor riesgo metabólico (Karastergiou et al, 2012); y un **fenotipo de “manzana” o androide**, asociado a los hombres, donde destaca la acumulación de VAT frente al SAT y por tanto aumenta el riesgo de desarrollo de comorbilidades (Geer & Shen, 2009). Estas diferencias en la distribución de la grasa son especialmente patentes hasta la edad post-menopáusica, momento en el que las mujeres comienzan a adquirir un fenotipo androide y por tanto su riesgo a padecer comorbilidades se iguala o incluso aumenta respecto a los hombres (Regitz-Zagrosek et al, 2006). Entre las causas que subyacen a estas diferencias destacan el distinto componente genético, la acción de las hormonas sexuales y la regulación del sistema inmune (Palmer & Clegg, 2015).

1.4. Alteraciones metabólicas en obesidad

La obesidad grave o mórbida se asocia a numerosas patologías como son hipertensión arterial, dislipidemia, IR, DM2, esteatosis hepática, síndrome de apnea obstructiva del sueño (SAOS), ECV y diversos tipos de cáncer (revisado en (Tchernof & Despres, 2013)). Dado que en esta Tesis Doctoral se profundizará en el estudio de pacientes diabéticos, a continuación se exponen las principales alteraciones metabólicas que ocasionan la aparición de DM2.

1.4.1. Señalización de insulina, IR y desarrollo de DM2

La insulina regula el transporte y el metabolismo de la glucosa, el crecimiento y la diferenciación celular y además posee importantes funciones neurotróficas (revisado en (Ketterer et al, 2011; Taniguchi et al, 2006)). En el hígado, la insulina suprime la liberación de glucosa mediante la inhibición de la gluconeogénesis y glucógenolisis, y promueve la síntesis de glucógeno; en el músculo esquelético, la insulina promueve la captación y la utilización de glucosa; y en el tejido adiposo, la insulina inhibe la lipólisis y aumenta el almacenamiento de triglicéridos (Taniguchi et al, 2006).

La IR se define como una respuesta inadecuada por parte de los tejidos insulino-dependientes a unos niveles normales de insulina circulantes (resistencia periférica) (Schenk et al, 2008). Dadas las funciones de esta hormona, este estado de resistencia se caracteriza por la menor disposición de glucosa para el músculo, la pérdida de la supresión de la producción hepática de glucosa y la alteración de la lipólisis en tejido adiposo, entre otros. Estas condiciones dan lugar a la aparición de un estado hiperglucémico (al principio “virtual”) y un aumento de los niveles plasmáticos de ácidos grasos. Esta

hiperglucemia provoca una respuesta compensatoria de las células β del páncreas que secretan más insulina (dando lugar a hiperinsulinemia), para intentar alcanzar un estado normo-glucémico (Taniguchi et al, 2006). Si esta situación se prolonga en el tiempo, se produce el fracaso de las células β y su muerte celular (Stumvoll et al, 2005), desarrollando en primera instancia una intolerancia a la glucosa que progresará hacia la aparición de DM2.

2. MITOCONDRIA

La mitocondria es el orgánulo energético por excelencia y está presente en el citoplasma de todas las células eucariotas con metabolismo aerobio (Alberts et al, 2002). Su función principal consiste en la oxidación de metabolitos (procedentes mayoritariamente de glúcidos y lípidos) para generar energía en forma de ATP. No obstante, la mitocondria desempeña también un papel muy importante regulando otros procesos como la apoptosis, la homeostasis del calcio y el sodio, la cetogénesis o la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Cheng & Ristow, 2013; Starkov, 2008).

El metabolismo mitocondrial es el origen y diana de numerosas señales nutricionales que integran respuestas fisiológicas para mantener la sensibilidad a insulina (Koliaki & Roden, 2016). A este respecto, la mitocondria coordina si los ácidos grasos y metabolitos que le llegan son oxidados a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) y la cadena de transporte electrónico (ETC) o si se acumulan en forma de triglicéridos en el citoplasma hasta que la célula los necesite (Kusminski & Scherer, 2012; Sun et al, 2011). Además, existe una importante sincronización entre la biogénesis mitocondrial y la adipogénesis (De Pauw et al, 2009). De hecho, para que se produzca la correcta diferenciación de adipocitos es esencial que exista un aumento sincronizado del metabolismo mitocondrial con una subida de ROS justo al comienzo de este proceso (Tormos et al, 2011). Por tanto, no es de extrañar que alteraciones en el metabolismo mitocondrial tengan consecuencias sobre la adipogénesis, y viceversa.

2.1. (Dis)función mitocondrial

La respiración celular es el proceso molecular mediante el cual se consume O_2 y se genera CO_2 . Durante este proceso, la energía liberada se acumula en forma de equivalentes reductores de las moléculas de NADH y $FADH_2$ que son utilizados para la generación de ATP gracias al sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS). Una de las características más especiales de este sistema es su doble origen genético. La mitocondria posee un ADN mitocondrial (ADNmt) propio que codifica a 13 subunidades del sistema OXPHOS. El resto de proteínas de OXPHOS y del proteoma mitocondrial, están codificadas por el genoma nuclear. Esto implica que dichas proteínas han de ser correctamente sintetizadas en el citoplasma e importadas a la mitocondria, estableciéndose una comunicación núcleo-mitocondria esencial para el mantenimiento de la homeostasis celular (Cagin & Enriquez, 2015). Además también existe una importante comunicación retículo endoplásmico (RE)-mitocondria. El RE participa en la síntesis y plegamiento de proteínas (Chevet et al, 2001), así como en la señalización del calcio, entre otras

funciones (Giorgi et al, 2009). La red mitocondrial y del RE interactúan físicamente a través de unas estructuras conocidas como MAMs (*mitochondria associated membranes*) cuya alteración se ha relacionado con la disrupción de la homeostasis celular (Patergnani et al, 2011).

2.1.1. El sistema OXPHOS

El sistema OXPHOS lo conforman los complejos de la ETC y la ATP sintasa (Saraste, 1999). Los complejos de la ETC consisten en una serie de agregados supramoleculares (enumerados del I al IV) formados por flavoproteínas, proteínas hierro-sulfuro, ubiquinonas y citocromos que actúan secuencialmente. A grandes rasgos, las moléculas reductoras de NADH y FADH₂ ceden sus electrones a nivel de los complejos I y II respectivamente, de manera que se genera un flujo de electrones que culmina en la reducción del O₂ a H₂O por parte del complejo IV. Durante el flujo de electrones se genera una diferencia de potencial gracias al bombeo de protones hacia el espacio intermembrana por parte de los complejos I, III y IV. Esta fuerza protón-motriz es utilizada finalmente por el complejo ATP sintasa para generar ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico (**Figura 3**).

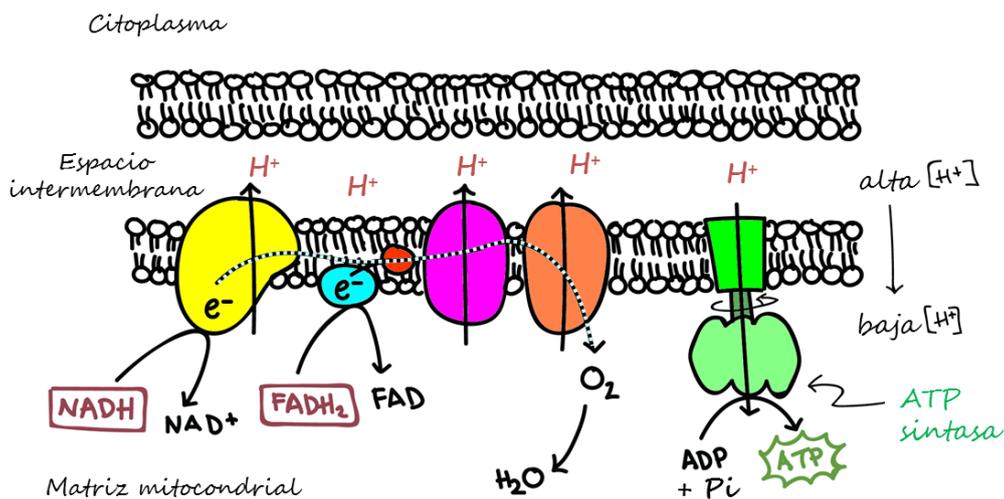


Figura 3 | Esquema del sistema OXPHOS. Los electrones son cedidos por el NADH al complejo I (NADH deshidrogenasa) y por el FADH₂ al complejo II (succinato deshidrogenasa). A continuación, los electrones pasan a la coenzima Q y desde allí son transferidos al complejo III (ubiquinona-citocromo c oxido-reductasa), al citocromo c y por último al complejo IV (citocromo c oxidasa), el cual reduce el O₂ a H₂O. El transporte electrónico (representado con una línea discontinua) está acoplado al bombeo de protones (H⁺) hacia el espacio intermembrana por parte de los complejos I, III y IV, lo que establece un gradiente de potencial en la membrana mitocondrial interna. Finalmente, el flujo de H⁺ hacia la matriz dirige la síntesis de ATP por medio del complejo ATP sintasa. Figura modificada de Khan Academy (<https://www.khanacademy.org/>).

2.1.2. Disfunción mitocondrial y patologías asociadas

Clásicamente, el concepto de “disfunción mitocondrial” se refería a la incapacidad de la mitocondria para generar y mantener suficientes niveles de ATP a través de OXPHOS en respuesta a las

demandas energéticas de la célula (Brand & Nicholls, 2011). Actualmente, este término es mucho más amplio y se extiende también a las alteraciones en el número de mitocondrias, la arquitectura mitocondrial y/o respuestas fisiológicas maladaptativas que desembocan en daños metabólicos (Gao et al, 2014; Kusminski & Scherer, 2012).

Debido a la naturaleza de su metabolismo oxidativo, la mitocondria es la fuente más importante de ROS (Kowaltowski et al, 2009). A pesar de que estas ROS tengan funciones fisiológicas relevantes como la regulación de la proliferación y diferenciación celular (Wang & Hai, 2015), si se acumulan excesivamente pueden desencadenar lo que se conoce como **estrés oxidativo** (Romano et al, 2014). El estrés oxidativo produce daño directo sobre todos los componentes celulares provocando: peroxidación lipídica (Paradies et al, 2009), oxidación de proteínas (Stadtman, 2006) y mutaciones en el ADNmt y nuclear (Bohr, 2002), entre otras alteraciones. Actualmente numerosos estudios enmarcan al estrés oxidativo y a la disfunción mitocondrial como procesos íntimamente ligados al envejecimiento (Batic & Larsson, 2013; Genova & Lenaz, 2015) y al desarrollo de numerosas patologías, entre ellas enfermedades neurodegenerativas (Moon & Paek, 2015), hepáticas (Auger et al, 2015), cáncer (Schwartz & Yehuda-Shnaidman, 2014), así como obesidad y sus comorbilidades (James et al, 2012; Kusminski & Scherer, 2012; Patti & Corvera, 2010). Es importante señalar que la relación de la mitocondria con el grado de sensibilidad a insulina es bidireccional ya que la disminución de la aportación de nutrientes a la mitocondria (por ejemplo en una situación de IR) puede alterar la respiración celular y, viceversa, la disminución de la capacidad oxidativa de la mitocondria puede provocar la alteración de flujos metabólicos con acumulación de metabolitos tóxicos (Gao et al, 2014). A esta compleja regulación se une que la actividad mitocondrial es bastante tejido-específica (Koliaki & Roden, 2016), de ahí que el reconocimiento del daño mitocondrial como causa o consecuencia de la aparición de IR siga siendo objeto de debate e investigación.

3. PROTEÓMICA

La proteómica puede definirse como el conjunto de metodologías destinadas al análisis del proteoma, es decir del conjunto de proteínas expresadas por el genoma de un sistema biológico en un momento y condiciones determinadas (Wilkins et al, 1996). Así, mientras que la genómica se ocupa de los actores potenciales de la actividad celular, la proteómica estudia los efectores de dicha función (Kinter & Sherman, 2000). Debido al marcado carácter dinámico del proteoma, en comparación al del genoma, su ámbito de estudio abarca no solo las proteínas presentes en un sistema, sino también sus isoformas, sus modificaciones postraduccionales (PTMs) y sus interacciones (Altelaar et al, 2013).

Pese a que las técnicas destinadas al estudio del proteoma son variadas, **la espectrometría de masas (MS)** constituye una herramienta fundamental en el análisis proteómico. Esta técnica analítica se introdujo en el análisis de péptidos y proteínas en los años 80 (Fenn et al, 1989; Karas & Hillenkamp, 1988), llegando a desplazar a la secuenciación de Edman y el análisis de aminoácidos como métodos preferidos de análisis de proteínas una década más tarde. Básicamente, un espectrómetro de masas

produce iones en fase gaseosa a partir de los analitos de interés, los cuales son separados (analizados) en función de su relación masa-carga (m/z) y, finalmente, detectados. Además, existe la posibilidad de inducir la fragmentación de los iones así obtenidos mediante el incremento de su energía cinética y su posterior colisión con moléculas neutras en fase gaseosa. Cuando el analito es un péptido, el espectro de fragmentación (MS/MS o MS^2) obtenido permite la determinación inequívoca de su secuencia por comparación con los espectros de fragmentación teóricos, que son calculados a partir de la secuencias aminoacídicas contenidas en bases de datos de proteínas (Eng et al, 1994). Para este fin se emplean motores de búsqueda basados en distintos algoritmos capaces de evaluar la significación estadística del ajuste entre los espectros de fragmentación experimentales y los teóricos.

3.1. Bases de la proteómica de alta resolución

Actualmente, a la hora de identificar y caracterizar proteínas de forma masiva la proteómica emplea de manera casi exclusiva la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS). De esta forma la mezcla compleja de proteínas (que puede llegar a englobar el proteoma completo de un tejido, célula u orgánulo) se digiere enzimáticamente, se separa mediante cromatografía líquida (LC), normalmente de alta presión o alta resolución (HPLC), y se analiza en un espectrómetro de masas acoplado en línea al cromatógrafo. Este abordaje permite la identificación masiva de proteínas de forma rápida, automática, reproducible y con una cobertura y un rango dinámico superiores a los de la antigua estrategia electroforética (Link et al, 1999; Washburn et al, 2001) (**Figura 4**).

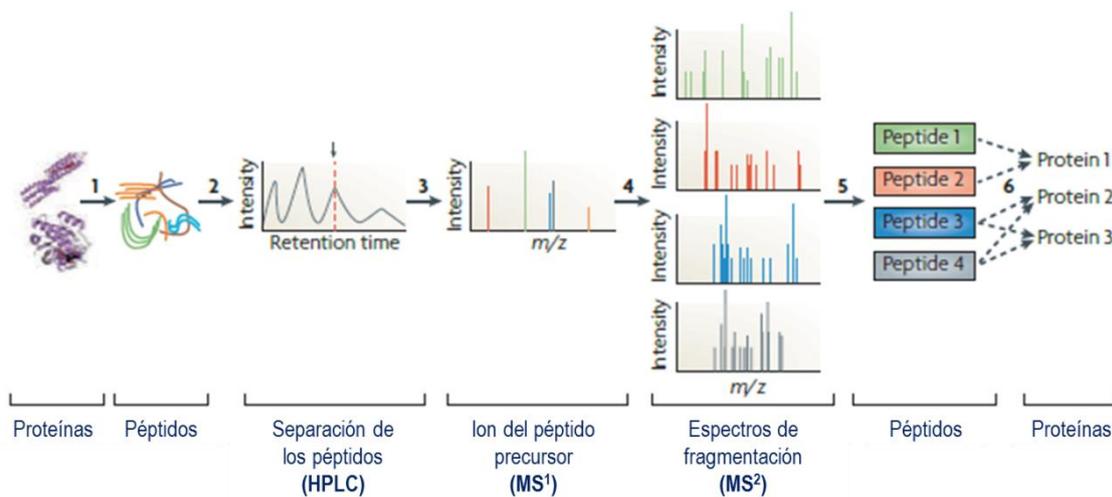


Figura 4 | Identificación de proteínas mediante LC-MS. Los extractos proteicos se digieren dando lugar a péptidos (**paso 1**) que son separados mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (**paso 2**). A medida que los péptidos eluyen son ionizados en el espectrómetro de masas para obtener el espectro de masas de los denominados iones precursores (etapa MS^1) (**paso 3**). Finalmente el espectrómetro de masas induce la fragmentación por colisión de los iones precursores para obtener los correspondientes espectros de iones fragmento característicos de cada péptido (espectros de fragmentación, etapa MS^2) (**paso 4**), cerrando un ciclo que se repite a lo largo de todo el gradiente cromatográfico. Mediante algoritmos de búsqueda en bases de datos se asigna a cada

espectro de fragmentación la secuencia de su péptido correspondiente (McHugh & Arthur, 2008) y se establece una tasa de error de acuerdo con diversos métodos probabilísticos (**paso 5**). Por último, durante la etapa de inferencia las secuencias peptídicas así identificadas son asignadas a las proteínas de las que provienen (**paso 6**). Dado que existen péptidos comunes a varias proteínas, este proceso de inferencia constituye un área activa de investigación (Nesvizhskii & Aebersold, 2005). Figura adaptada de (Ahrens et al, 2010).

La determinación precisa de los niveles de abundancia de las proteínas en los estudios de proteómica diferencial no es un asunto trivial. Las estrategias de cuantificación que precinden de la utilización de marcajes (*label free*) para la comparación de dos o más muestras problema se basan en el simple recuento de péptidos de las proteínas identificadas; sin embargo, la fiabilidad de este tipo de aproximaciones ha sido puesta en entredicho, debido al carácter parcialmente estocástico del proceso de selección de iones en LC-MS (**Figura 4, paso 4**) (Li et al, 2012). Por ello se han desarrollado diversos **tipos de marcajes**, basados fundamentalmente en el uso de isótopos estables (SIL), que se utilizan habitualmente en proteómica de expresión diferencial: i) marcajes metabólicos, basados en la incorporación de isótopos de nitrógeno o aminoácidos marcados en células *in vivo* o en cultivo (SILAC) (Ong et al, 2002); ii) marcajes enzimáticos, como la introducción de átomos de ^{18}O en el extremo carboxilo terminal de los péptidos producidos mediante digestión triptica (Fenselau & Yao, 2007); y iii) marcaje mediante la utilización de reactivos químicos como ICAT (*isotope-coded affinity tags*), iTRAQ (*isobaric tag for relative and absolute quantification*) y TMT (*tandem mass tag*) (Gygi et al, 1999; Ross et al, 2004; Thompson et al, 2003). En el presente trabajo de Tesis Doctoral se ha utilizado el marcaje iTRAQ para los estudios de proteómica cuantitativa.

3.1.1. La metodología iTRAQ

Tal como se introdujo en líneas anteriores, el marcaje iTRAQ es un tipo de marcaje químico basado en etiquetas isobáricas que reaccionan con el extremo amino y las lisinas de los péptidos. Los péptidos provenientes de cada condición a comparar (hasta un máximo de ocho) son marcados con una etiqueta específica que permite su cuantificación relativa de forma simultánea (*multiplexing*) (Nikolov et al, 2012; Ross et al, 2004). Tras el marcaje isobárico diferencial se mezclan las distintas muestras y se procede a su análisis masivo por MS. El marcaje isobárico determina que una misma secuencia peptídica marcada con distintas etiquetas (una por condición) dé lugar a un único precursor en el espectro de masas MS^1 (**Figura 4, paso 3**) cuya intensidad es la suma de las intensidades de cada uno de los componentes isobáricos. La fragmentación (MS^2) del precursor libera iones reporteros monocargados (a m/z 114, 115, 116 y 117, en el caso del iTRAQ 4-plex) cuya intensidad es proporcional a la abundancia del péptido en cada una de las condiciones objeto de estudio, permitiendo así su cuantificación relativa (**Figura 5**).

Entre las ventajas que ofrece iTRAQ frente a otras técnicas SIL destaca que la cuantificación se lleve a cabo en el espectro de fragmentación, lo que le proporciona una gran especificidad. Además, la intensidad del precursor es la suma de las intensidades de cada uno de sus componentes isotópicos

provenientes de las distintas condiciones a comparar, lo cual redonda en una mayor sensibilidad y permite la utilización de cantidades menores de proteínas (Evans et al, 2012), algo especialmente deseable en el caso de muestras biológicas.

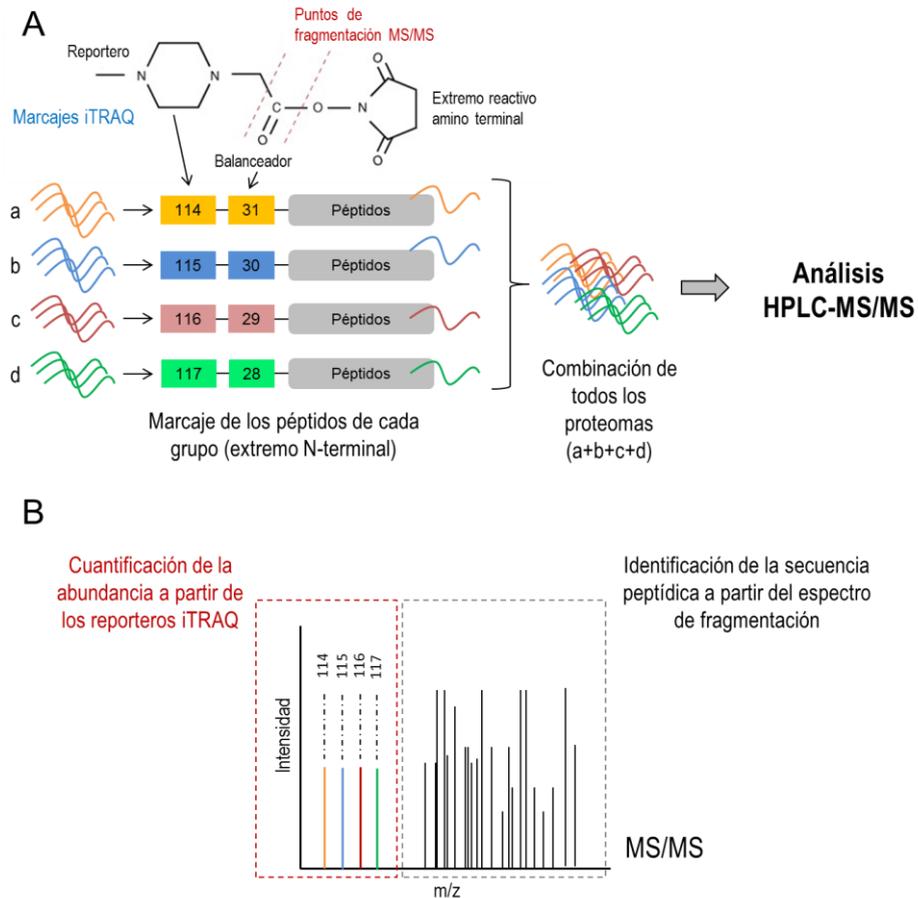


Figura 5 | Bases de la metodología iTRAQ. (A) El reactivo iTRAQ consta de un extremo reactivo que reacciona con el extremo amino y los residuos de lisina de los péptidos, un reportero de masa variable y un balanceador que permite que la masa de la etiqueta incorporada a los péptidos sea idéntica para una misma secuencia peptídica proveniente de las distintas condiciones consideradas. De esta forma esos péptidos isobáricos coeluirán en un único tiempo cromatográfico. (B) En la fragmentación del precursor único en el espectrómetro de masas, los reporteros iTRAQ se liberan dando lugar a señales a m/z 114, 115, 116 y 117, en el caso del marcaje iTRAQ 4-plex, cuya intensidad refleja la abundancia relativa del correspondiente péptido en cada condición (a, b, c, d). La identificación de la secuencia peptídica se lleva a cabo sobre la base del espectro de fragmentación.

En cuanto a sus limitaciones, el marcaje iTRAQ requiere que las etapas de marcaje y de fragmentación se produzcan eficazmente para asegurar la fiabilidad de los resultados (Nikolov et al, 2012). A estas limitaciones se suma la carencia de modelos estadísticos adecuados capaces de evaluar y paliar en la medida de lo posible la variabilidad inherente al proceso (Luo & Zhao, 2012). Para subsanar estos defectos, en la presente Tesis Doctoral se aplicó el modelo estadístico WSPP (*Weighted Spectrum, Peptide and Protein*), un modelo válido para el análisis de péptidos marcados con iTRAQ (Navarro et al,

2014). Cabe destacar que la implementación de esta metodología ha permitido evaluar los cambios dinámicos de las modificaciones oxidativas en el proteoma (McDonagh et al, 2012), abriendo camino a los estudios de proteómica diferencial destinados al análisis masivo de PTMs (Martinez-Acedo et al, 2012).

3.1.2. Proteómica redox y análisis sistemático de modificaciones oxidativas en residuos de Cys

Aunque los estudios proteómicos construyen el camino entre los estudios genómicos y funcionales, el estudio sistemático de PTMs supone un gran avance en relación a los mecanismos moleculares de regulación. El desarrollo de técnicas para el marcaje isotópico de péptidos y la purificación selectiva de los péptidos modificados han permitido aplicar estas metodologías al análisis sistemático de PTMs haciéndolas estandarizables y asequibles (Choudhary et al, 2009; Zhou et al, 2001). El rango de PTMs que pueden estudiarse es muy amplio incluyendo, entre otras, acetilaciones, fosforilaciones, ubiquitinaciones, metilaciones y oxidaciones (Altelaar et al, 2013). Sin embargo, en los últimos años ha destacado el análisis de modificaciones oxidativas, lo que ha dado lugar a lo que se conoce como proteómica redox (Bachi et al, 2013; Ckless, 2014; Lennicke et al, 2016).

En general, el papel de las modificaciones oxidativas en condiciones fisiopatológicas sigue siendo bastante desconocido. Frecuentemente se asocian con estrés oxidativo derivado de ROS y especies reactivas del nitrógeno (RNS), si bien es cierto que dichas modificaciones forman parte de importantes mecanismos regulatorios dentro de la célula (Holmstrom & Finkel, 2014). La naturaleza de las modificaciones oxidativas puede ser reversible (como las S-nitrosilaciones, la formación de puentes disulfuro o las sulfenilaciones) o irreversible (como las carbonilaciones, las sulfonilaciones o sulfinilaciones, entre otras). Las modificaciones reversibles suelen asociarse a fenómenos de señalización redox o daño oxidativo leve (Go et al, 2015) mientras que las modificaciones irreversibles se asocian a un daño oxidativo más severo (Lennicke et al, 2016).

Aunque los aminoácidos que pueden sufrir modificaciones oxidativas son varios, se considera que el aminoácido más sensible a ellas es la cisteína (Cys) debido a su naturaleza química y el rango de modificaciones que puede sufrir en su grupo tiol (Salsbury et al, 2008). Los residuos de Cys, altamente reactivos y conservados, están a menudo presentes en dominios catalíticos de proteínas (Go et al, 2015), por lo que se los considera auténticos “interruptores” moleculares de la actividad celular (Schafer & Buettner, 2001). Se han descrito diversas implicaciones para las modificaciones oxidativas en Cys, entre las que destacan el aumento o disminución de la función, la alteración de la localización subcelular de las proteínas afectadas, la modificación de las interacciones proteína-proteína y la regulación de la estabilidad (Holmstrom & Finkel, 2014). En los últimos años la importancia de estas modificaciones ha tomado una especial relevancia en el estudio de la mitocondria (Bak & Weerapana, 2015), orgánulo que es considerado el principal contribuyente a la concentración de ROS intracelular (Kowaltowski et al, 2009).

3.2. Aplicación de herramientas de Biología de Sistemas a los análisis proteómicos

El ser humano ha sido capaz de describir un sinfín de procesos moleculares concretos, como por ejemplo, la secreción de insulina por células β -pancreáticas, la sinapsis neuronal o diversas cascadas moleculares. Sin embargo, sigue sin poder responder a cuestiones más amplias que abarcan procesos biológicos complejos como “por qué envejecemos” o “cómo podemos evitar la aparición de diabetes”. La Biología de Sistemas nace para intentar responder este tipo de preguntas. Para ello, aborda el análisis de estos procesos biológicos desde una perspectiva global combinando técnicas –ómicas de alta resolución con estudios de redes de interacciones y simulación computacional (Klipp et al, 2009).

Actualmente se sabe que los procesos celulares se llevan a cabo por conjuntos de proteínas que trabajan en forma de complejos o rutas funcionales y cuyas tareas se llevan a cabo de forma coordinada (Foster et al, 2006; Hansson et al, 2012). Este concepto de “coordinación” se ha abordado desde diversas perspectivas y se ha relacionado a procesos de co-expresión génica (Wei et al, 2006) o regulaciones unidireccionales de complejos moleculares que pertenecen a la misma vía de señalización, fundamentalmente (Sprinzak et al, 2009).

3.2.1. Concepto de cambios proteicos coordinados

Gracias a las técnicas proteómicas de alta resolución, a día de hoy somos capaces de evaluar cambios en la abundancia de miles de proteínas en un solo experimento. Sin embargo, el investigador tiene que establecer unos umbrales arbitrarios de confianza que determinen qué proteínas presentan cambios significativos. Esto ha ocasionado que la mayoría de los estudios proteómicos descritos hasta la fecha se hayan centrado exclusivamente en el análisis de proteínas individuales, limitando sus conclusiones y pasando por alto otro tipo de fenómenos. Analizar de forma ponderada el conjunto de cambios sufridos por todas las proteínas que pertenecen a una ruta o función molecular ofrece un nivel superior de evaluación con especial relevancia en el análisis de modelos biológicos, donde el tipo de respuestas observadas no son del tipo “todo o nada” (**Figura 6**).

En esta Tesis Doctoral se ha optado por realizar un análisis basado en la evaluación de cambios proteicos coordinados con el objetivo de profundizar en el conocimiento del envejecimiento y la DM2 en un contexto de obesidad (dos fenómenos complejos dentro de una enfermedad multifactorial). Para ello, se ha utilizado el modelo SBT (*Systems Biology Triangle*), un algoritmo especialmente útil en estudios de proteómica diferencial (Garcia-Marques et al, 2016).

3.3. Estudios proteómicos previos en tejido adiposo humano

El grupo de la Dra. Belén Peral ha sido pionero en la aplicación de técnicas proteómicas al estudio del tejido adiposo humano (Corton et al, 2008; Corton et al, 2004). Estos estudios dieron pie a una creciente línea de investigación (Perez-Perez et al, 2012a; Perez-Perez et al, 2012b; Perez-Perez et al, 2009) a la que se unieron otros investigadores (extensamente revisado en (Kim et al, 2015; Murri et al, 2014;

Peinado et al, 2012; Renes & Mariman, 2013)). Aunque estos estudios han realizado importantes descubrimientos acerca de la etiología de la obesidad y la biología del tejido adiposo, es importante señalar que la mayoría de estos trabajos se engloban dentro de lo que conocemos como “Proteómica clásica” recurriendo a estrategias como la electroforesis bi-dimensional. Además la gran mayoría se basan en estudios *in vitro* o de modelos de ratón (Kim et al, 2015; Renes & Mariman, 2013), y en los casos de estudios relacionados con la obesidad y la DM2 estos han evaluado principalmente otros tejidos insulino-dependientes como el músculo o el hígado (Hwang et al, 2010; Valle et al, 2012).

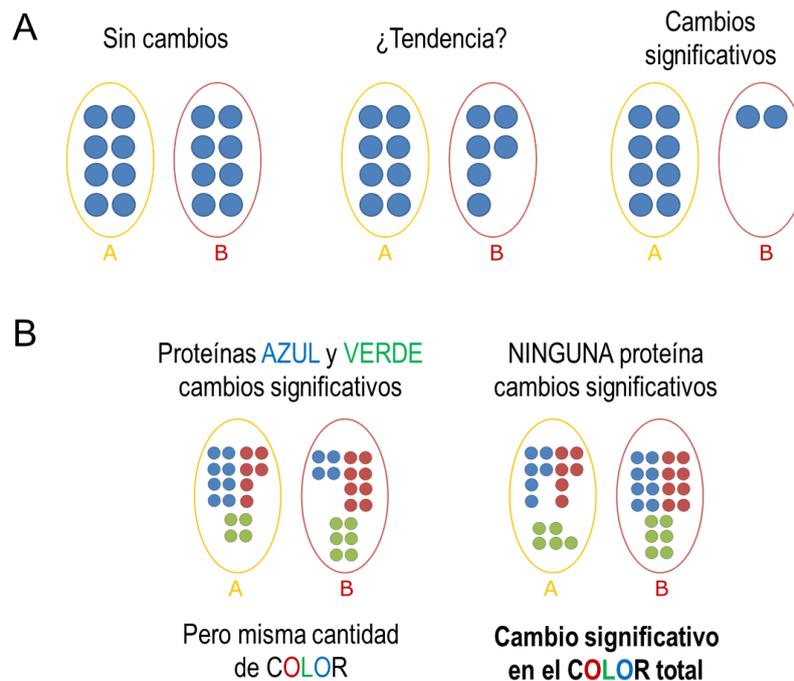


Figura 6 | Visualización del concepto de cambios coordinados y su importancia en estudios biológicos. El **panel A** muestra el análisis de una proteína individual en dos condiciones. Dependiendo del criterio (más o menos estricto) del investigador las diferencias pueden establecerse como significativas o tan solo como una tendencia, limitando las conclusiones derivadas en el estudio. En el **panel B** se muestra un caso más cercano “a la realidad biológica” donde los cambios se producen en varias proteínas a la vez (marcadas en diferentes colores). De acuerdo a un criterio estricto, las proteínas azul y verde se mostrarían alteradas significativamente en la situación de la izquierda pese a que el color entre ambos grupos no está alterado. Por el contrario, en la situación de la derecha ninguna de las proteínas mostraría diferencias significativas bajo el mismo criterio, mientras que la “función” color sí estaría alterada entre ambas condiciones. Los análisis de cambios coordinados tratan de encontrar este tipo de alteraciones que, en caso de no analizarse en su conjunto, serían obviadas al no tener lugar cambios drásticos en la abundancia de las proteínas individuales.

Los trabajos publicados que han utilizado técnicas proteómicas de alta resolución para el estudio del tejido adiposo humano son muy escasos (Fang et al, 2015; Kim et al, 2014). La mayoría de estos estudios se basan en células adiposas aisladas (Xie et al, 2010), en modelos *in vitro* de células 3T3-L1 (Lee et al, 2013; Ye et al, 2011) o en células madre derivadas del tejido adiposo humano (Kim et al, 2010;

Oswald et al, 2011). Debido a las ventajas que presentan este tipo de técnicas y que apenas existían trabajos proteómicos previos que evaluaran los efectos del envejecimiento (Alfadda et al, 2013) y la DM2 (Kim et al, 2014; Murri et al, 2013) sobre el tejido adiposo humano, en esta Tesis Doctoral decidimos estudiar estos procesos mediante la aplicación de técnicas proteómicas de alta resolución y herramientas de Biología de Sistemas.

3.4. Estudios proteómicos previos en mitocondria

Tal como se introdujo anteriormente, la mitocondria se encuentra en una encrucijada metabólica por lo que comprender su funcionamiento bajo situaciones fisiológicas y patológicas siempre ha sido siempre de interés para la comunidad científica. Con frecuencia, los métodos elegidos para abordar estas cuestiones han sido la evaluación directa de la capacidad funcional y respiratoria de estos orgánulos en distintos tejidos y situaciones, lo que llevó a concluir que la actividad mitocondrial es bastante tejido-específica (Koliaki & Roden, 2016). Con la llegada de las técnicas proteómicas de alta resolución y la posibilidad relativamente sencilla de obtener mitocondrias aisladas mediante protocolos de centrifugación diferencial, los investigadores tuvieron a su disposición una serie ventajas que permitió, entre otras, descifrar el proteoma mitocondrial de los mamíferos (Calvo et al, 2016; Pagliarini et al, 2008).

En el contexto de la obesidad y la DM2, la mitocondria ha sido ampliamente explorada en tejidos insulino-dependientes como el hígado y el músculo esquelético, principalmente en modelos animales (revisado en (Peinado et al, 2014)). En relación al tejido adiposo, cabe destacar el estudio de Forner y col. en el que se analizaron comparativamente las mitocondrias aisladas a partir de tejido adiposo blanco y marrón, destacando la función anabólica y detoxificadora de la grasa blanca (Forner et al, 2009). También destaca el estudio de Newton y col. que describió las variaciones del proteoma mitocondrial durante el proceso de diferenciación de adipocitos (Newton et al, 2011). En el contexto del envejecimiento, la mayoría de los estudios del proteoma mitocondrial se han centrado en modelos de neurodegeneración animal (revisado en (Butterfield et al, 2016; Ingram & Chakrabarti, 2016)), destacando en este caso el interés por la aplicación de proteómica redox (Perluigi et al, 2014).

Como puede intuirse en las líneas anteriores, en general apenas existen estudios que hayan analizado el proteoma mitocondrial humano de forma directa. El primer tejido del que se aislaron mitocondrias para estudiar su proteoma fue la placenta (Rabilloud et al, 1998) y después le siguieron el músculo esquelético y cardíaco (Goudarzi et al, 2011; Lefort et al, 2009; Taylor et al, 2003) y algunos modelos celulares (Dai et al, 2010). Al comienzo de esta Tesis Doctoral existía un gran vacío referente al proteoma mitocondrial en tejido adiposo humano, motivo por el que se decidió realizar un análisis detallado de sus modificaciones con el envejecimiento y la DM2 en adipocitos, su principal componente (Gomez-Serrano et al, 2017). No obstante, es preciso destacar que durante el desarrollo de nuestro trabajo se publicó un estudio del proteoma mitocondrial de adipocitos humanos (Lindinger et al, 2015), aunque la resolución y el alcance de sus conclusiones fue bastante limitado.

objetivos.

“Todo investigador tiene algún plan. Aspira a descubrir algo, y tiene ideas sobre cómo intentar llegar a ello, y sobre cómo es probable –a veces simplemente posible– que surja un camino viable. Pero en una carrera de investigación pura, el resultado de mañana puede hacer abandonar el plan de hoy. No se puede fijar un itinerario en un terreno inexplorado”

Alberto Sols García (1917 - 1989)

Hasta la fecha, los estudios proteómicos que han utilizado muestras de tejido adiposo humano son relativamente escasos y el espectro de proteínas cuantificadas muy reducido. La aplicación de técnicas proteómicas de alta resolución al estudio de la obesidad ha quedado restringida a modelos animales, centrándose principalmente en otros tejidos insulino-dependientes como el músculo o el hígado. El avance de estas metodologías ha conseguido abarcar el estudio de proteomas completos, lo cual posibilita la aplicación de herramientas de Biología de Sistemas. Por estos motivos, en el presente Trabajo de Tesis Doctoral se plantearon los siguientes objetivos:

1. Aplicación de la metodología iTRAQ-LC/MS para el análisis cuantitativo del proteoma del VAT en el contexto fisiopatológico de la obesidad
2. Estudio de los cambios proteómicos del VAT asociados al envejecimiento en obesidad sin enfermedad metabólica
3. Estudio de los cambios proteómicos del VAT asociados al desarrollo de DM2 en obesidad
4. Estudio de los cambios proteómicos del VAT en obesos diabéticos de distinto género

A la vista de los resultados obtenidos en los estudios de envejecimiento y DM2, el análisis exhaustivo de la mitocondria ofrecía nuevas posibilidades para entender el papel de la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo en la fisiopatología de la obesidad. Además, en el momento de plantearnos este trabajo no existían referencias en la literatura que hubieran abordado ni el proteoma mitocondrial de adipocitos humanos ni sus modificaciones oxidativas a gran escala. Por ello, se plantearon también los siguientes objetivos:

5. Aplicación de la metodología iTRAQ-LC/MS para el análisis cuantitativo del proteoma y del redoxoma tiólico mitocondrial de adipocitos humanos aislados
6. Estudio de los cambios en el proteoma y redoxoma tiólico mitocondrial asociados al envejecimiento en obesidad sin enfermedad metabólica
7. Estudio de los cambios en el proteoma y redoxoma tiólico mitocondrial asociados al desarrollo de DM2 en obesidad
8. Validación funcional de la alteración mitocondrial asociada a DM2

materiales y
métodos.

“La práctica es un maestro excepcional.”

Cayo Plinio El joven, *Caius Plinius Caecilius Secundus* (61 - 112)

1. DECLARACIONES ÉTICAS

Los estudios realizados en esta Tesis Doctoral se han llevado a cabo bajo las recomendaciones éticas recogidas en la Declaración de Helsinki (1967) y con respeto a la Ley de Investigación Biomédica Española (Ley 14/2007). Los proyectos de investigación involucrados fueron aprobados por los Comités Éticos de los Hospitales Clínico San Carlos (14/441-E, 2014) y Gregorio Marañón (obesCSIC001, 2012; Proteo_Adi 148/16, 2016) de Madrid (España). Todos los pacientes fueron informados de la finalidad de la investigación y dieron su consentimiento previo a la participación.

Este trabajo ha sido elaborado bajo las pautas, principios y compromisos recogidos por el Código de Buenas Prácticas del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

2. DISEÑO Y CONCEPCIÓN DE LOS ESTUDIOS

Durante el desarrollo de este trabajo de Tesis Doctoral se reclutaron más de 50 pacientes con obesidad mórbida ($IMC \geq 40 \text{ kg/m}^2$) intervenidos por cirugía bariátrica, momento en el que se obtuvieron las biopsias de tejido adiposo. En esta Tesis Doctoral, se describen dos estudios bien diferenciados:

- **Primer análisis** → Proteoma del VAT en obesidad: diferencias asociadas a la edad, la DM2 y el género
- **Segundo análisis** → Proteoma y redoxoma tóxico mitocondrial de los adipocitos (viscerales): diferencias asociadas a la edad y DM2

Ambos estudios partieron de la misma “cohorte inicial” de pacientes. Para obtener los perfiles proteómicos en cada uno de los análisis, se conformaron grupos constituidos por 4 individuos que compartían las características clínicas y antropométricas más homogéneas, de forma que las diferencias observadas entre ellos fueran únicamente atribuibles a: la edad, o la DM2 o al género (en el caso del primer análisis); y a la edad o la DM2 (en el caso del segundo) (**Figura 7**). Los grupos quedaron constituidos de la siguiente manera: obesas no diabéticas menores de 35 años, obesas no diabéticas mayores de 45 años, obesas diabéticas mayores de 45 años y obesos diabéticos mayores de 45 años (**Tabla 3**).

Las proteínas se obtuvieron a partir de las biopsias de tejido o de las mitocondrias, se combinaron equivalentemente formando una mezcla para cada grupo de pacientes y se digirieron en filtro mediante el protocolo FASP (*Filter-Aided Sample Preparation*). Posteriormente, los péptidos marcados mediante el uso de la tecnología iTRAQ se analizaron mediante HPLC-MS y se cuantificaron bajo el modelo WSPP (Navarro et al, 2014). En ambos análisis se aplicaron herramientas de Biología de Sistemas basadas en el modelo SBT (Garcia-Marques et al, 2016) y otros recursos informáticos. En el estudio del proteoma mitocondrial, se llevó a cabo un abordaje experimental basado en la tecnología GELSILOX (*GEL-based Stable Isotope Labeling of OXidized Cys*) (Martinez-Acedo et al, 2012), mediante el cual es posible marcar diferencialmente los residuos oxidados y reducidos de las Cys. Esta

metodología redox permitió analizar no solo los cambios a nivel de abundancia sino también a nivel de oxidación de proteínas.

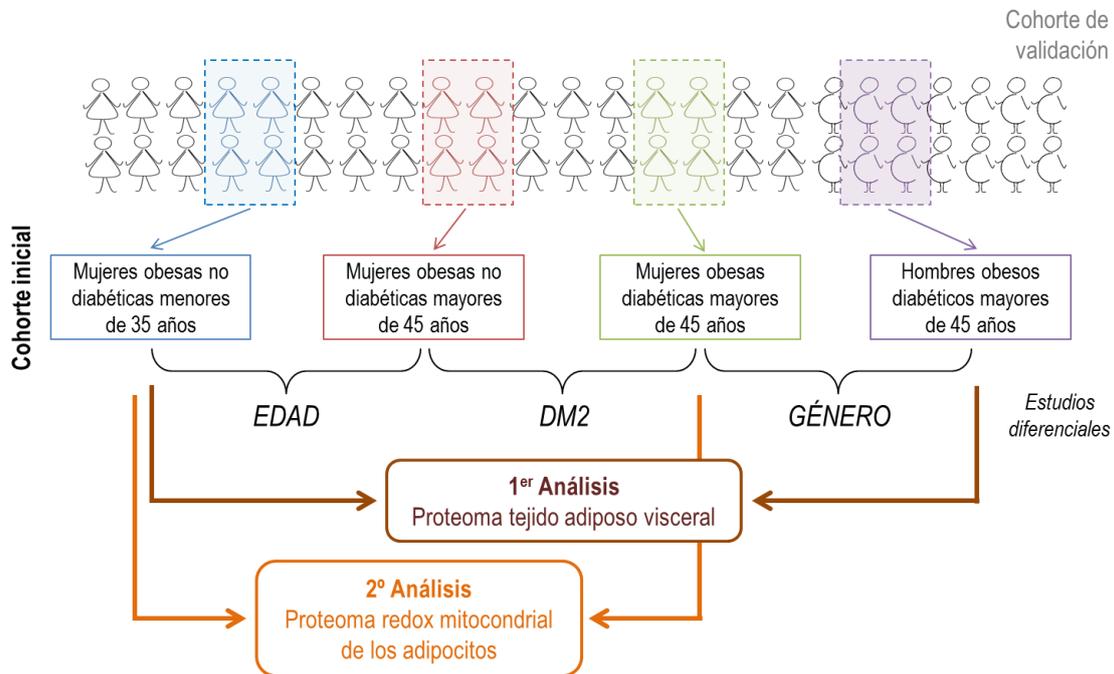


Figura 7 | Pacientes reclutados y esquema de los estudios comparativos abordados en esta Tesis Doctoral.

Todos los pacientes eran hombres o mujeres obesos mórbidos ($\text{IMC} \geq 40 \text{ kg/m}^2$) que fueron operados de cirugía bariátrica. Para los análisis proteómicos se constituyó una “cohorte inicial” formada por 4 grupos de pacientes de 4 sujetos cada grupo con la peculiaridad de que esos 4 individuos tenían características clínicas y antropométricas muy homogéneas. Estos grupos fueron: obesas no diabéticas menores de 35 años (señaladas en azul), obesas no diabéticas mayores de 45 años (en rojo), obesas diabéticas mayores de 45 años (en verde) y obesos diabéticos mayores de 45 años (en púrpura). La comparación entre las obesas no diabéticas menores de 35 años y mayores de 45 años mostraría las diferencias atribuibles a la edad (en un contexto de obesidad mórbida sin DM2); la comparación entre las obesas mayores de 45 años diabéticas y no diabéticas informaría de las diferencias asociadas a la DM2; y la comparación entre hombres y mujeres diabéticos revelaría el dimorfismo sexual existente en DM2. El proteoma del tejido adiposo se analizó en los 4 grupos de pacientes dando lugar a 3 estudios comparativos: edad, DM2 y género. El proteoma mitocondrial se analizó en los 3 grupos de pacientes mujeres, dando lugar a 2 estudios comparativos: edad y DM2. El resto de los pacientes incluidos en el estudio formaron parte de la “cohorte de validación” (ilustrada en gris), para realizar ensayos adicionales de validación de los diferentes estudios proteómicos. Figura modificada de (Gomez-Serrano et al, 2017).

Con el objetivo de validar los resultados obtenidos en los estudios proteómicos, se constituyó una “cohorte de validación” formada por el resto de pacientes ($n=32$ en el caso del análisis de tejido, $n=20$ para el mitocondrial). Esta cohorte se analizó mediante técnicas alternativas como la inmunohistoquímica (IHC), el *Western-blot* (WB), la electroforesis en gel en condiciones nativas (BN-PAGE) o ensayos de actividad enzimática.

Tabla 3 | Características clínicas y antropométricas de los pacientes incluidos en los análisis proteómicos. Las variables se expresan como la media \pm DE. Para la comparación entre las variables se aplicó el test de ANOVA simple con el contraste *post hoc* de Bonferroni. Tabla adaptada de (Gomez-Serrano et al, 2016; Gomez-Serrano et al, 2017).

	PRIMER ANÁLISIS (Proteoma tejido adiposo)				ANOVA (p) Primer análisis	ANOVA (p) Segundo análisis
	Mujeres obesas no diabéticas menores de 35 años (n=4)	Mujeres obesas no diabéticas mayores de 45 años (n=4)	Mujeres obesas diabéticas mayores de 45 años (n=4)	Hombres obesos diabéticos mayores de 45 años (n=4)		
Edad (años)	32 \pm 4	51 \pm 5 *	50 \pm 6 *	49,75 \pm 3 *	0,00	0,00
Índice de masa corporal, IMC (kg/m ²)	43,65 \pm 3,37	44,75 \pm 6,85	46,63 \pm 6,05	44,18 \pm 5,86	0,89	0,76
Perímetro de cintura (cm)	117,25 \pm 8,77	120,50 \pm 8,23	127,25 \pm 2,99	128,25 \pm 14,22	0,33	0,19
Glucemia (mmol/L)	5,29 \pm 0,27	5,64 \pm 0,63	8,78 \pm 4,12	9,68 \pm 3,89	0,12	0,13
HbA1c (%)	5,55 \pm 0,24	5,60 \pm 0,14	7,50 \pm 2,00	7,03 \pm 1,43	0,10	0,07
Triglicéridos (mmol/L)	1,31 \pm 0,32	1,65 \pm 0,53	2,08 \pm 1,18	1,61 \pm 0,65	0,55	0,40
Colesterol total (mmol/L)	4,95 \pm 0,67	5,28 \pm 0,52	4,46 \pm 1,46	4,29 \pm 1,49	0,60	0,52
Colesterol LDL (mmol/L)	2,91 \pm 0,30	3,11 \pm 0,43	2,31 \pm 1,01	2,38 \pm 1,15	0,46	0,26
Colesterol HDL (mmol/L)	1,44 \pm 0,38	1,40 \pm 0,15	1,20 \pm 0,14	1,16 \pm 0,22	0,29	0,37

* $p < 0,01$, diferencias significativas en comparación a *Mujeres obesas no diabéticas menores de 35 años*, según el contraste *post hoc* de Bonferroni.

3. MUESTRAS BIOLÓGICAS

Todos los pacientes que participaron en este estudio eran hombres y mujeres obesos mórbidos (IMC \geq 40 kg/m²) que fueron operados de cirugía bariátrica por laparoscopia. Todos eran de origen caucásico e informaron de que su peso corporal se había mantenido estable durante al menos los tres meses anteriores a la intervención. Las biopsias de tejido adiposo se extrajeron después de una noche de ayuno, se lavaron tres veces en solución de tampón fosfato salino (PBS), y se dividieron en trozos que fueron o bien inmediatamente congelados en nieve carbónica y almacenados a -80 °C hasta la extracción de proteína, o bien transportados en Medio 199 equilibrado con sales de Hank (Cat. 22350, Gibco-Life Technologies) para el aislamiento de adipocitos en el laboratorio. Las muestras se obtuvieron al comienzo de la cirugía y siempre de la misma localización anatómica en todos los sujetos. Las muestras de VAT se

tomaron a partir del *omentum* y en el caso del SAT, de la zona superficial peri-umbilical. El presente trabajo de Tesis Doctoral solo se centra en los resultados obtenidos con las muestras procedentes del VAT, si bien el proceso de recepción y manipulación de las muestras se realizó paralelamente para ambos tejidos.

Ninguno de los sujetos no diabéticos que participaron en los análisis proteómicos (cohorte inicial) sufría DM2 u otra comorbilidad asociada a la obesidad como hipertensión, dislipidemia, SAOS o ECV; ni se encontraba bajo un tratamiento farmacológico que pudiera afectar a las conclusiones del análisis. En el caso de la cohorte de validación se toleró que los sujetos no diabéticos padecieran una comorbilidad siempre que esta no fuera DM2 o ECV. **El criterio de inclusión** para los sujetos diabéticos fue una historia clínica de DM2 de al menos dos años de antigüedad. La DM2 se estableció a partir de una glucemia en ayunas ≥ 7 mmol/L y una hemoglobina glicosilada (HbA1c) $\geq 6,5$ % de acuerdo a los criterios recogidos por la Asociación Americana de Diabetes (American Diabetes, 2014). Todos los sujetos con DM2 tomaban antidiabéticos orales y en algunos casos se trataban con insulina u otros fármacos, con el fin de controlar las comorbilidades.

Los **criterios de exclusión** para todos los pacientes contemplaron: i) enfermedad hepática o neurológica clínicamente significativa u otra enfermedad sistémica grave, incluyendo tumores malignos; ii) historia de abuso de drogas o alcohol, definida como > 80 g/día, o actividad transaminasa en suero más del doble del límite superior del rango normal; iii) concentración de creatinina sérica elevada; iv) evento cardiovascular agudo en los 6 meses anteriores; v) enfermedades agudas o evidencia actual de enfermedades crónicas inflamatorias o infecciosas; y vi) enfermedad mental que impidiera que los sujetos no pudieran entender la naturaleza, alcance y posibles consecuencias del análisis.

3.1. Separación de adipocitos y SVF

El tejido adiposo fresco se transportó al laboratorio en Medio 199 con sales de Hank y se procesó totalmente en un plazo de 2 h. El aislamiento de adipocitos y separación del SVF se realizó de acuerdo a procedimientos estándares poniéndose a punto enteramente en el laboratorio (Gomez-Serrano et al, 2017). El tejido adiposo se lava tres veces con PBS y se fragmenta con tijeras sobre una placa Petri hasta que se obtienen trozos de 1-2 mm³, y, una vez desmenuzado, se digiere en una solución de Colagenasa tipo I (Cat. M0A3689, Worthington Biochemical Corp.) al 0,2% en PBS (5 mL de solución/g de tejido) durante 60 min en un baño de agua a 37°C con agitación suave (~40 rpm) (**Figura 8A**). La reacción de digestión se inactiva con suero fetal bovino (FBS) y la suspensión se centrifuga a 200 xg durante 10 min a temperatura ambiente (RT). Tras esa centrifugación se pueden reconocer tres fases diferentes: la fase superior o lipídica que contiene los adipocitos; una fase intermedia que consiste en la solución de digestión, y un precipitado de color rojo que constituye el SVF (**Figura 8B**). Los adipocitos se recogen con ayuda de una pipeta *Pasteur* y se suspenden en PBS para filtrarlos a través de una malla de acero de 500 μ m de diámetro de poro. Después, se centrifugan a 100 xg durante 3 min a RT y se recambia el PBS, haciendo un lavado (**Figura 8C**). En total, se realizan tres lavados para eliminar restos de SVF.

Finalmente, se separan diferentes volúmenes de adipocitos (desde 250 μ L hasta 1 mL) asegurándonos de extraer todo el PBS y se almacenan a -80°C para análisis posteriores (**Figura 8D**).

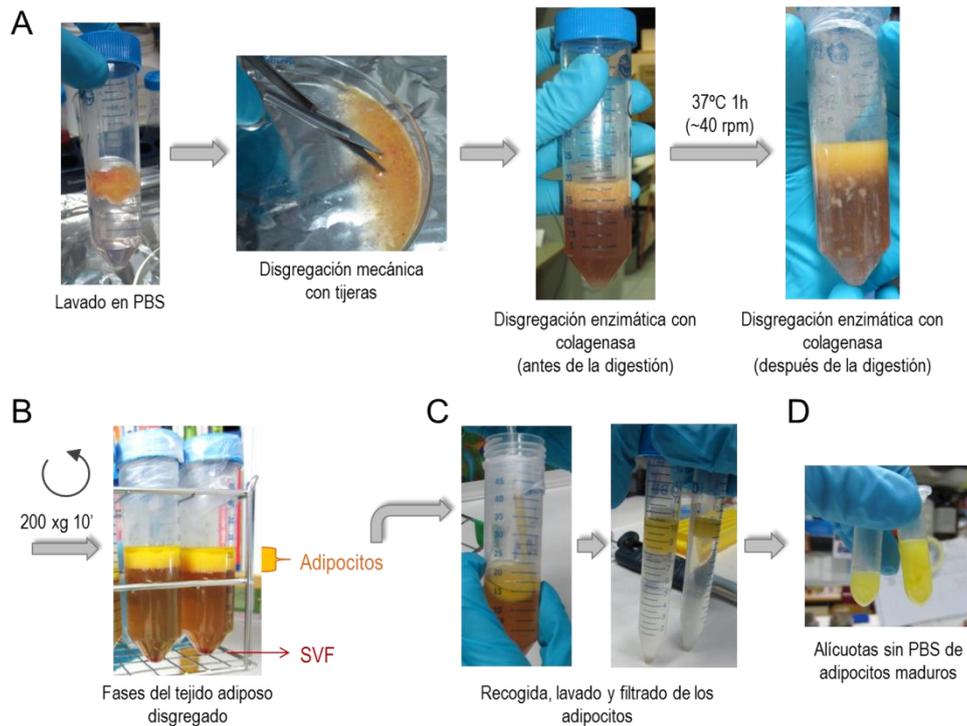


Figura 8 | Procesamiento de tejido adiposo fresco para la separación de adipocitos y SVF. La figura muestra imágenes representativas de los pasos críticos del protocolo. **(A)** Lavado del tejido en PBS y etapas de disgregación: mecánica, con la ayuda de tijeras y enzimática, mediante la incubación en una solución de colagenasa a 37°C . **(B)** Tras la disgregación, la separación de las dos fases se consigue mediante centrifugación leve (200 xg durante 10 min). Se distinguen dos fases bien diferenciadas: una lipídica superior que contiene los adipocitos, y un precipitado rojizo que contiene el SVF. **(C)** Manipulación de los adipocitos. Tras recogerlos, tienen que ser lavados y filtrados para retirar los restos de SVF. **(D)** Fraccionamiento de los adipocitos y almacén a -80°C hasta su posterior manipulación. Figura modificada de (Gomez-Serrano et al, 2017).

Para el procesamiento del SVF se decanta la solución de digestión y se suspende el precipitado en PBS. Después se filtra por una malla de nylon de 100 μm de poro (Cat. 352360, Falcon) y se centrifuga a 200 xg durante 10 minutos a RT. Se retira el PBS por decantación y se trata al SVF con una Solución de Lisis de Eritrocitos (EDTA, 0,05 M, NH_4Cl 8,26%, KHCO_3 1%, pH 7,4) durante al menos 15 minutos a RT. Después de la lisis, se realizan tres lavados en PBS (centrifugando a 100 xg durante 5 min a RT) y el precipitado final se almacena seco a -80°C para análisis posteriores.

3.2. Aislamiento de mitocondrias

El aislamiento de mitocondrias se realizó a partir de adipocitos extraídos del VAT mediante dos protocolos distintos. Las limitaciones en la disponibilidad de la muestra y la escasez del contenido mitocondrial de los adipocitos hicieron descartar la realización de protocolos de purificación más rigurosos.

3.2.1. Tecnología MACS

Para el análisis proteómico, el enriquecimiento mitocondrial se realizó con la tecnología MACS usando el *Mitochondrial Isolation Kit* (Cat. 130-094-532, Miltenyi Biotec.) adaptando las instrucciones del fabricante a nuestra muestra. Las mitocondrias se obtuvieron a partir de 1-2 mL de adipocitos congelados por paciente. Los adipocitos se descongelaron sobre hielo y se suspendieron en el tampón de lisis (*Lysis Buffer*) proporcionado por el kit en una proporción 1:1 (v:v) suplementado con un cóctel de inhibidores de proteasas (*Halt Protease Inhibitor Cocktail*, Cat. 78440, Thermo Scientific). Para la homogeneización, se les pasó 25 veces un pistón de cristal tipo B en un homogeneizador de tipo *Douncer* sobre hielo durante 15 min. Después de la homogeneización, la muestra de los adipocitos se suspendió en el tampón de separación (*Separation Buffer*) proporcionado por el kit y se filtró a través de una malla de nylon de 100 µm de poro (Cat. 352360, Falcon) previamente al marcaje con microbolas magnéticas recubiertas de anti-TOM22 (subunidad de 22 kDa de la translocasa de la membrana mitocondrial externa) humana. Después de 2 h de incubación con rotación a 4°C, la solución se filtró de nuevo a través de una malla de nylon de 50 µm de poro (Cat. 352340, Falcon) y se cargó en una columna MACS LS (Cat. 130-042-401, Miltenyi Biotec.) previamente situada en el soporte magnético (Cat. 130-042-302/303, Miltenyi Biotec.). Las mitocondrias, marcadas magnéticamente gracias a las microbolas anti-TOM22, quedaron retenidas dentro de la columna, mientras que los orgánulos y otros componentes celulares no marcados corrieron a través de ella. Después de varios lavados, se retiró la columna del soporte magnético, y las mitocondrias retenidas se eluyeron con 1,2 mL de tampón de separación. Esta solución mitocondrial se centrifugó a 12 000 xg durante 2 min a 4°C. El sobrenadante se desechó y el sedimento se suspendió en 0,5 mL de tampón de almacenamiento (*Storage Buffer*) para eliminar los restos de proteína procedentes del *Separation Buffer*. Finalmente, se centrifugó de nuevo a 12 000 xg durante 2 min y los precipitados de mitocondrias se secaron y congelaron a -80°C hasta la extracción de proteínas.

3.2.2. Protocolo ABCAM

Para llevar a cabo los ensayos de validación utilizando una técnica diferente a la anteriormente descrita, las mitocondrias de los adipocitos se aislaron mediante el *Mitochondria Isolation Kit – MitoSciences* (Cat. ab110171, Abcam) adaptando levemente las instrucciones del fabricante. Las mitocondrias se obtuvieron a partir de 1-2 mL de adipocitos congelados por paciente. Los adipocitos se descongelaron y se suspendieron en el Reactivo A proporcionado por el kit en una proporción 1:1 (v:v), se agitaron vigorosamente y se dejaron incubar en hielo durante 10 min. Después, se transfirieron al homogeneizador de tipo *Douncer* y se pasó 25 veces el pistón de cristal tipo B. El homogeneizado se centrifugó a 1 000 xg durante 10 min a 4 °C, se recuperó el sobrenadante y con el precipitado restante se repitieron los pasos anteriores (ruptura y centrifugación) utilizando el mismo volumen de Reactivo B. Tras recuperar el segundo sobrenadante, se combinó con el primero y ambos se centrifugaron a 12 000 xg durante 15 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante, y el precipitado final que contenía las mitocondrias

se trató de dos maneras distintas en función del ensayo posterior al que se iba a destinar: para los análisis en condiciones nativas (BN-PAGE) el precipitado se secó y se almacenó a -80°C ; para los ensayos de WB y de actividad enzimática mediante inmunocaptura, el precipitado se suspendió en Reactivo C, se separaron diferentes volúmenes y se almacenaron a -80°C hasta su utilización. El volumen de Reactivo C utilizado dependió del tamaño del precipitado mitocondrial, oscilando desde los 50 a los 100 μL .

La concentración de mitocondrias en la suspensión se midió mediante el ensayo colorimétrico del ácido bicinónico (BCA) de *Pierce* (Cat. 23227, Thermo Scientific). Las muestras se analizaron en duplicado a una absorbancia de 562 nm utilizando como patrón albúmina de suero bovina (BSA). Todas las muestras con concentración menor a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ fueron descartadas por encontrarse fuera del rango de medida lineal.

4. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Los ensayos de microscopía electrónica se realizaron con el objetivo de comprobar el grado de integridad de las mitocondrias aisladas. Para ello, se recurrió a los servicios del Laboratorio de Microscopía Electrónica del Servicio Interdepartamental de Investigación (SIDI) de la Universidad Autónoma de Madrid (UAM).

El aislamiento mitocondrias mediante la tecnología MACS se verificó mediante microscopía electrónica de transmisión. Tras eluir de la columna, las mitocondrias se fijaron directamente sobre el *Separation Buffer* (pH 7,4) con glutaraldehído y paraformaldehído a una concentración final del 2,5% cada uno durante 1 h a RT. El precipitado mitocondrial se obtuvo por centrifugación a 12 000 xg durante 2 min y se lavó con tampón fosfato 0,1 M. Después, la muestra fue post-fijada en una solución acuosa de OsO_4 al 1% durante 1 h a 4°C , se deshidrató en etanol-acetona y se embebió en resina *Durcupan* (Sigma-Aldrich). Las secciones ultra-finas (2 μm) se obtuvieron con un ultramicrotomo *Leica Reichert Ultracut S* (Leica Microsystems, Austria), se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo y se examinaron bajo el microscopio electrónico de transmisión *Jeol Jem1010* (Jeol, Japón).

5. ANÁLISIS E IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE TÉCNICAS PROTEÓMICAS DE ALTA RESOLUCIÓN

Los estudios proteómicos en los que se basa el presente trabajo de Tesis Doctoral se realizaron por la doctoranda en la Unidad Proteómica del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC) del Instituto de Salud Carlos III (Madrid), gracias a la realización de varias estancias. En esta memoria se redactan los pasos clave de los protocolos experimentales haciendo especial hincapié en las adaptaciones para cada una de las muestras y los distintos objetivos de los estudios. Para una mejor comprensión, se adjuntan dos esquemas que resumen el tratamiento de la muestra hasta su análisis por MS tanto para el estudio del proteoma del VAT (**Figura 9**) como el estudio del proteoma y redoxoma mitocondrial (**Figura 10**).

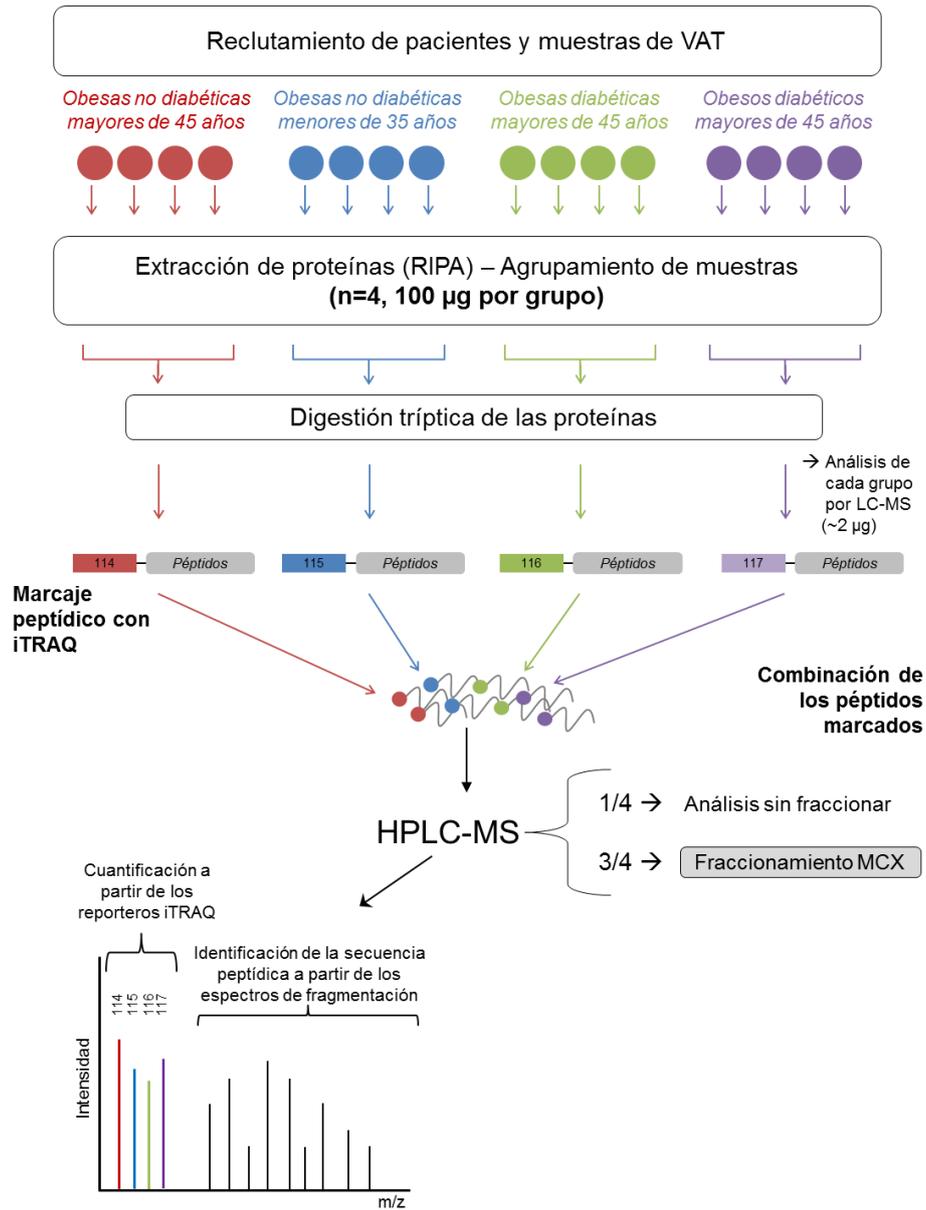


Figura 9 | Abordaje experimental en el análisis proteómico del VAT. Los extractos proteicos obtenidos de las muestras de cada paciente (n=16) se cuantificaron usando dos métodos diferentes para asegurar una adecuada agrupación de muestras. Para minimizar las diferencias entre grupos, la digestión de proteínas en filtro y su reducción con DTT se llevaron a cabo con las mezclas de proteínas que constituían cada uno de los grupos de pacientes (señalados en diferentes colores). Después de la digestión, cada una de las mezclas de péptidos (~2 µg) fue analizada por LC-MS para comprobar que la digestión era comparable entre los grupos (véase **Figura 11A**). Posteriormente, los péptidos de cada grupo se marcaron con sus correspondientes reporteros iTRAQ (señalados en la figura) y se mezclaron equimolecularmente. Para llevar a cabo los análisis por HPLC-MS la mezcla de péptidos marcados se dividió de manera que una quinta parte se analizó directamente y el resto se sometió a fraccionamiento MCX. Las distintas carreras MS permitieron la identificación de las secuencias de los péptidos basándose en los iones de los distintos espectros de fragmentación y la cuantificación de su abundancia relativa en cada uno de los grupos de acuerdo a la intensidad de iones de los reporteros iTRAQ en la región m/z baja. Figura modificada de (Gomez-Serrano et al, 2016).

5.1. Extracción de proteínas

5.1.1. Muestras del primer estudio (tejido adiposo total)

Las proteínas se extrajeron a partir de VAT (aproximadamente 100 mg) en tampón de ensayo de radioinmunoprecipitación (RIPA) (Tris-HCl 25 mM, pH 7,6, NaCl 150 mM, NP-40 1%, DOC 1%, SDS 0,1%) suplementado con inhibidores de proteasas (Thermo Scientific) usando el *Sample Grinding Kit* (Cat. 80-6483-3, GE Healthcare) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Este método se basa en la disrupción mecánica mediante el uso de una resina abrasiva que ayuda a la trituración mediante el uso de manos de mortero desechables.

Dado que el análisis por MS se realizó con grupos de muestras de pacientes, se utilizaron dos métodos diferentes para medir la concentración de proteínas para asegurar que todos los individuos contribuían equimolecularmente a la mezcla: el ensayo de BCA de *Pierce* (Thermo Scientific) y paralelamente el sistema de cuantificación basado en infrarrojos *Direct Detect* (EMD Millipore). Los ensayos se realizaron por duplicado por ambos métodos.

5.1.2. Muestras del segundo estudio (mitocondrias aisladas)

Las proteínas se extrajeron a partir de los precipitados mitocondriales congelados mediante suspensión en tampón RIPA suplementado con iodoacetamida (IAA) 50 mM. La extracción se llevó a cabo en oscuridad sobre hielo y aplicando agitaciones mediante vórtex cada 5 min durante 30 min. El sobrenadante proteico se obtuvo mediante centrifugación a 12 000 xg durante 10 min a 4 °C y se cuantificó por triplicado mediante el ensayo de BCA de *Pierce* (Thermo Scientific).

5.2. Preparación de la muestra en filtro

Tanto para el estudio de tejido como para el mitocondrial, los péptidos se obtuvieron mediante el protocolo FASP (*Protein Digestion Kit*, Cat. 44250, Expedeon), un método especialmente deseable para muestras que han sido solubilizadas en tampones con SDS (Wisniewski et al, 2009), como era nuestro caso. Además, este protocolo aumenta el rendimiento en la recuperación de los péptidos tras la digestión, lo que lo hace un método muy interesante para muestras con disponibilidad limitada. Para minimizar las diferencias, se trabajó con las mezclas proteicas procedentes de cada grupo de pacientes y no con las muestras individuales.

5.2.1. Muestras de tejido

Para cada conjunto de pacientes, se digirieron un total de 100 µg de proteínas (n=4, 25 µg por paciente). En primer lugar, las muestras se hirvieron en presencia de ditioneitol (DTT) 50 mM y se solubilizaron en un tampón de urea (USS) proporcionado por el kit. Tras cargarse las muestras en el filtro y realizarse varios lavados con tampón USS, los residuos tioles de las proteínas se carboximetilaron

mediante IAA durante 20 min a RT en oscuridad. El exceso de reactivo se eliminó con lavados sucesivos de USS y bicarbonato amónico 50 mM mediante centrifugación (10 000 xg a RT durante 10 min).

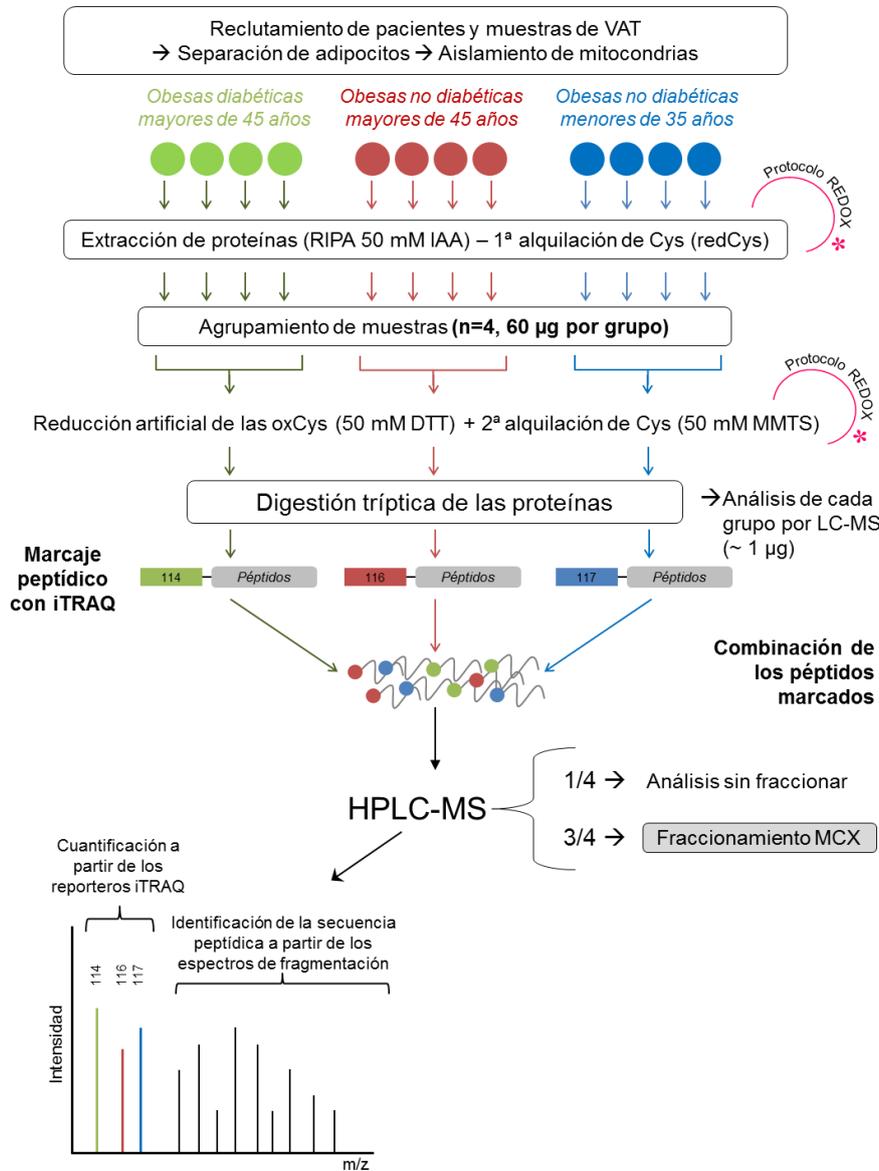


Figura 10 | Abordaje experimental en el análisis proteómico de las mitocondrias aisladas de los adipocitos.

Las muestras de cada paciente (n=12) se procesaron individualmente durante la recolección, separación de las fracciones adiposas y etapas de aislamiento mitocondrial. Durante la extracción de proteínas de las mitocondrias, la alquilación de Cys libres (reducidas) se realizó con IAA 50 mM. Se mezclaron las proteínas de cada grupo de pacientes para llevar a cabo los siguientes procesos: reducción artificial de oxCys con DTT, alquilación con MMTS y digestión de las proteínas. Después de la digestión, cada una de las mezclas de péptidos (~1 µg) se analizó por LC-MS para comprobar que la digestión era comparable entre los grupos (véase **Figura 11B**). A continuación, los péptidos de cada grupo se marcaron con sus correspondientes reporteros iTRAQ (señalados en la figura) y se mezclaron equimolecularmente. Para llevar a cabo los análisis por HPLC-MS, la mezcla de péptidos marcados se dividió de manera que una cuarta parte se analizó directamente y el resto se sometió a fraccionamiento MCX. Las distintas carreras MS permitieron la identificación de las secuencias de los péptidos basándose en los iones de los

distintos espectros de fragmentación y la cuantificación de su abundancia relativa en cada uno de los grupos de acuerdo a la intensidad de iones de los reporteros iTRAQ en la región m/z baja. Los pasos del protocolo de marcaje diferencial de Cys propio del abordaje de proteómica redox se muestran señalados con un asterisco (*). Figura modificada de (Gomez-Serrano et al, 2017).

5.2.2. Muestras de mitocondrias: marcaje diferencial de residuos Cys

Para cada conjunto de pacientes, se digirieron un total de 60 µg de proteínas (n=4, 15 µg por paciente). En primer lugar, las muestras se hirvieron durante 5 min y se cargaron en el filtro solubilizadas en USS mediante sucesivas centrifugaciones. A continuación, se añadió DTT 50 mM para reducir los puentes disulfuro de las proteínas retenidas en el filtro durante 1h a RT con agitación (~400 rpm). El exceso de reactivo se eliminó con una solución Hepes 50 mM, EDTA 1 mM a pH 7,5 (centrifugando a 10 000 xg durante 10 min a RT). Después, se llevó a cabo una segunda alquilación de las proteínas con metilmetanotiosulfonato (MMTS) 20 mM durante 45 min a RT en oscuridad. El exceso de reactivo se eliminó con lavados sucesivos de USS y bicarbonato amónico 50 mM mediante centrifugación (10 000 xg durante 10 min a RT).

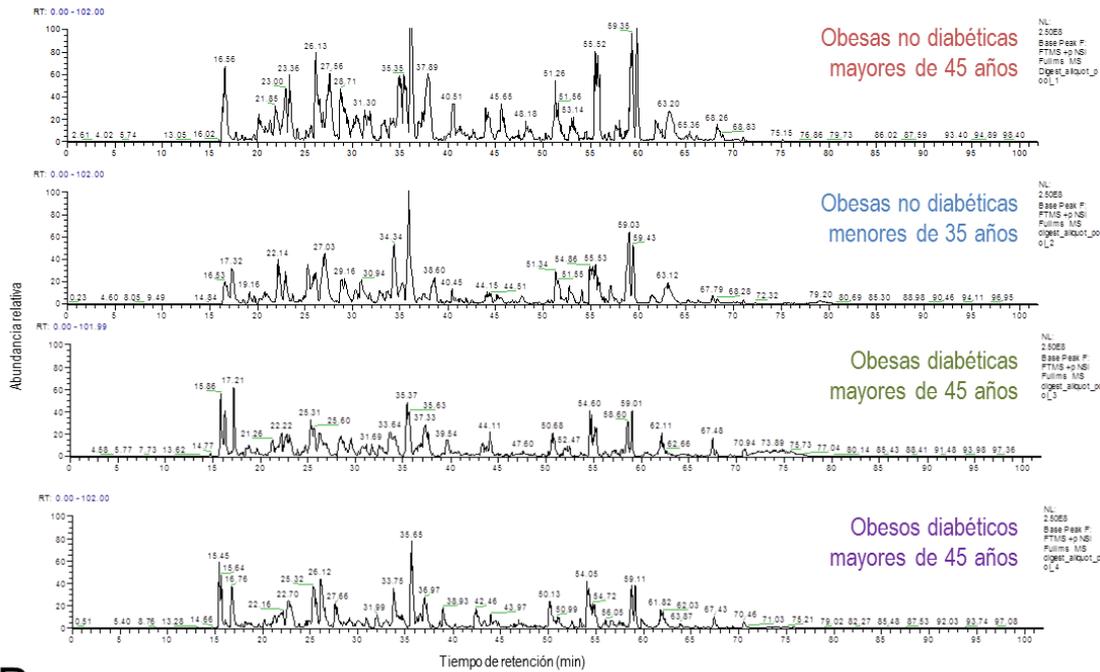
5.3. Digestión en filtro

Los extractos proteicos retenidos en el filtro se incubaron a 37°C toda la noche (ON) con una solución de tripsina en bicarbonato amónico 50 mM a una proporción 1:40 (tripsina:proteína) con agitación suave (~120 rpm). Al día siguiente, los péptidos resultantes se obtuvieron añadiendo una solución NaCl 500 mM y centrifugando a 16 000 xg durante 15 min a RT. Posteriormente se desalaron en columnas OASIS HLB C18 (Waters) utilizando distintas soluciones ácidas y se secaron con centrifuga de vacío *Savant SPD111V* (Thermo Scientific). El rendimiento de la digestión se comprobó para cada uno de los conjuntos de pacientes mediante análisis LC-MS en ambos estudios (**Figura 11**).

5.4. Marcaje iTRAQ y fraccionamiento peptídico

Las muestras se marcaron con iTRAQ de tipo *4-plex* (4 reporteros distintos) como se resume en las **Figuras 9 y 10**. Para cada marcaje, los péptidos secos se suspendieron en 30 µL de tampón trietilamonio bicarbonato (TEAB) 0,5 M y se marcaron con 70 µL del correspondiente reactivo iTRAQ en etanol al 70% (v/v) durante 1 h a RT. Para detener la reacción de marcaje se añadieron 100 µL de ácido trifluoroacético (TFA) al 0,5% (v/v) y se incubó durante 30 min a RT. Las muestras de péptidos de cada conjunto de pacientes se mezclaron y se secaron al vacío para eliminar los posibles restos de etanol. Por último, los péptidos marcados se diluyeron en 200 µL de TFA 1% (v/v), se sonicaron durante 5 min y se desalaron en columnas OASIS HLB C18 (Waters). Llegado este punto, el material a analizar se separó en varias partes:

A Proteínas de VAT (2 µg por grupo)



B Proteínas de mitocondrias (1 µg por grupo)

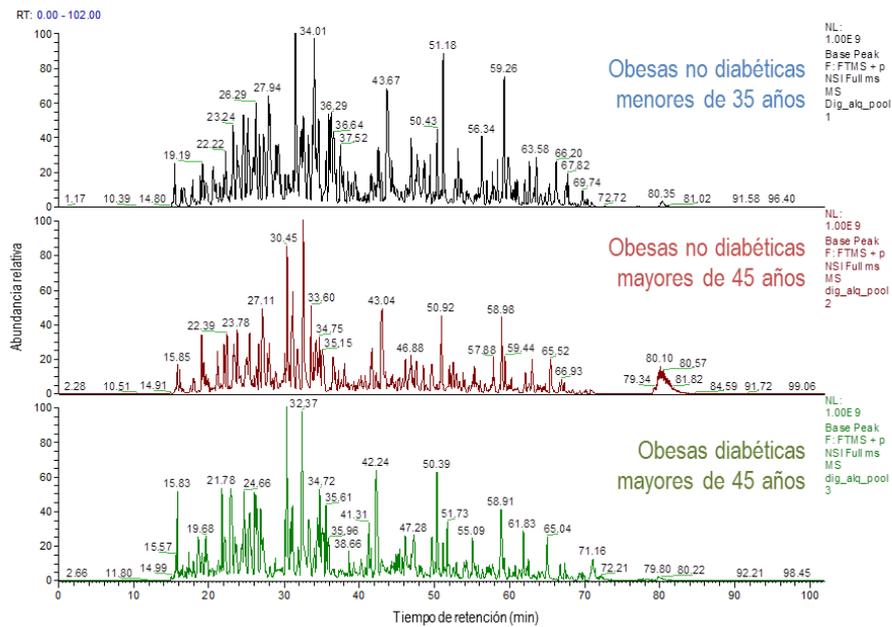


Figura 11 | Cromatogramas de las muestras de digestión. Tras la digestión y antes de proceder al marcaje iTRAQ, las muestras procedentes de tejido adiposo (A) y de mitocondrias aisladas (B) se analizaron mediante HPLC-MS. Se muestran los cromatogramas de cada uno de los grupos de pacientes. Los péptidos se analizaron en un aparato de *nano-HPLC Easy nLC 1000* (Thermo Scientific) acoplado a un espectrómetro de masas *Orbitrap Elite Hybrid Ion Trap-Orbitrap Spectrometer* (Thermo Scientific) con un gradiente de cromatografía de 60 min.

- En las muestras de tejido: 1/5 de los péptidos marcados se secaron al vacío para realizar una carrera LC-MS sin fraccionar. Los 4/5 restantes se sometieron a un fraccionamiento en columnas de intercambio catiónico OASIS MCX (Waters), utilizándose 6 tampones de elución que dieron lugar a 8 fracciones (**Tabla 4**). Las fracciones se desalaron en *MicroSpin Columns C18* (Waters), se secaron al vacío y se almacenaron a 4°C hasta su análisis por HPLC-MS.

- En las muestras de mitocondrias: se separó 1/4 de la muestra y se secó al vacío para realizar dos carreras de material sin fraccionar y los 3/4 restantes se sometieron a fraccionamiento por intercambio catiónico (**Tabla 4**), desalado y secado al vacío como se llevó a cabo para el estudio de tejido.

Tabla 4 | Fraccionamiento en columna de intercambio catiónico (OASIS MCX) de los péptidos obtenidos. Se muestran las fracciones obtenidas y la composición de los tampones de elución correspondientes. Para mejorar el rendimiento y la resolución de los estudios, algunas de las fracciones se juntaron previamente al análisis por HPLC-MS (ver **Figura 12**). AF, ácido fórmico; ACN, acetonitrilo.

Composición del tampón	Fracciones de elución (Tejido)	Fracciones de elución (Mitocondrias)
AF 0,5 M, ACN 25%	1	1
AF 1 M, ACN 25%	2	2
AF 1,5 M, ACN 25%	3	3
AF 0,5 M, ACN 25%, KCl 1,5 M	4	4
AF 1,25 M, ACN 37.5%	5 y 6	-
AF 1 M, ACN 50%	7 y 8	5

5.5. HPLC y análisis por MS

Los análisis de alta resolución de los péptidos marcados con iTRAQ se llevaron a cabo en un aparato de cromatografía nano-HPLC *Easy nLC 1000* (Thermo Scientific) acoplado a un espectrómetro de masas tipo *Q Exactive Hybrid Quadrupole-Orbitrap*, en el caso del estudio de tejido adiposo, y *Orbitrap Fusion Tribrid*, en el caso del estudio de las mitocondrias (ambos de Thermo Scientific). Los péptidos se suspendieron en ácido fórmico (AF) al 0,1%, se cargaron en una pre-columna *PepMap100 C18 LC* (75 µm ID, 2 cm, Thermo Scientific) y se separaron en línea en una columna analítica *NanoViper PepMap 100 C18 LC* (75 µm ID, 50 cm, Thermo Scientific) aplicando un gradiente continuo de solución B de 8-31% durante 240 min y de 31-90% durante 2 min a 200 nL/min (Solución B = acetonitrilo, ACN, 90%; AF 0,1%). La ionización de los péptidos se realizó a 4,5 kV en una aguja de electronebulización *Picotip* (New Objective). Los parámetros del espectrómetro de masas, el número de *microscans*, la energía de colisión normalizada y los parámetros de exclusión dinámica usados han sido descritos previamente (Gomez-Serrano et al, 2016; Gomez-Serrano et al, 2017).

En el caso del análisis de tejido, se registraron un total de 7 conjuntos de datos o carreras MS: una procedente del material no fraccionado y otras seis de las correspondientes fracciones MCX, dando lugar a un tiempo total de adquisición de aproximadamente 32 h (**Figura 12A**).

En el caso del análisis mitocondrial, el tiempo total de adquisición fue de 25 h registrado en un total de 5 carreras MS: dos procedentes del material no fraccionado y tres de las fracciones MCX. Excepcionalmente, en una de las carreras MS el tiempo de gradiente ascendió a los 360 min con el objetivo de aumentar la profundidad del estudio (**Figura 12B**).

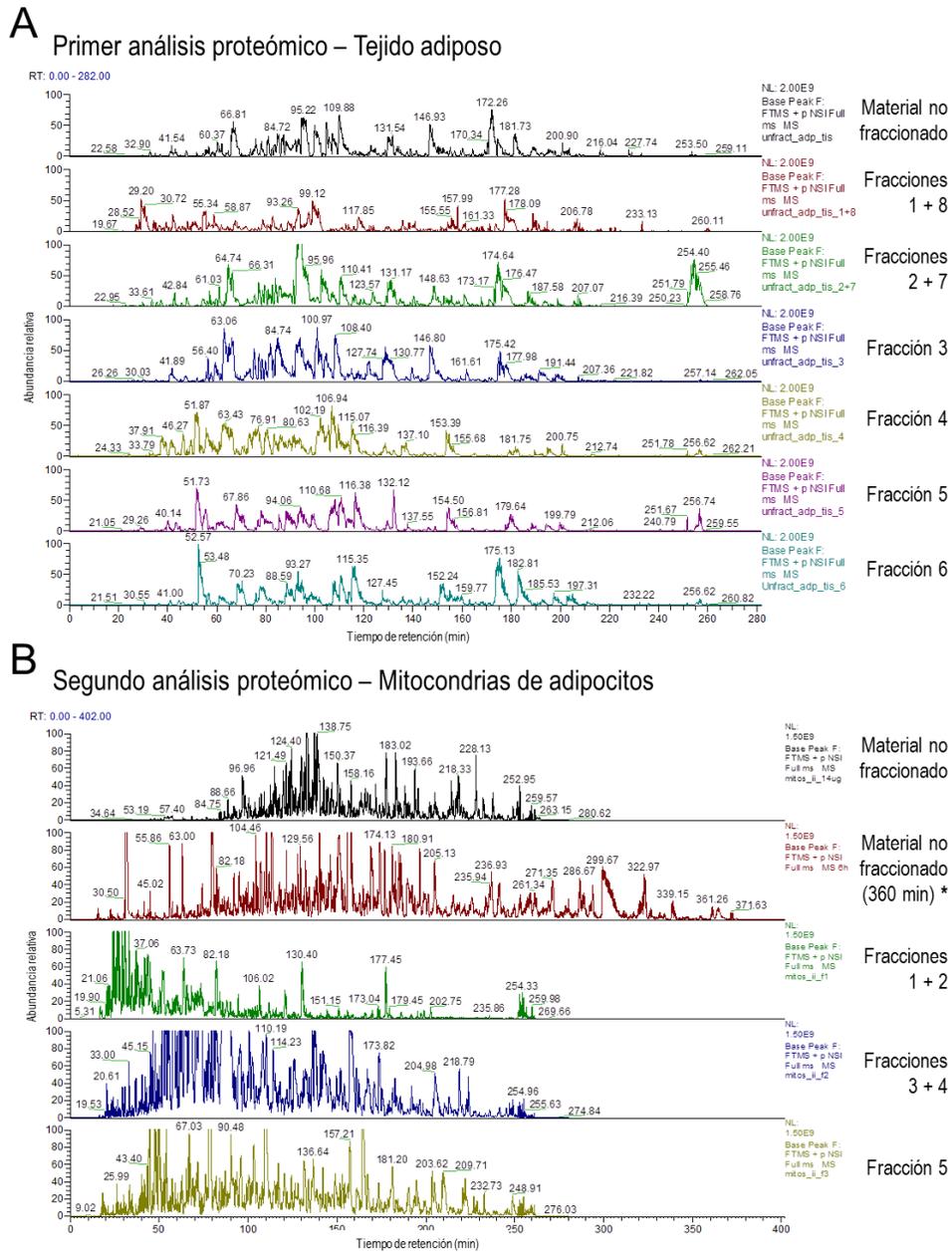


Figura 12 | Análisis HPLC en los estudios proteómicos. Se muestran los cromatogramas correspondientes a los análisis HPLC-MS de las muestras iTRAQ procedentes de tejido adiposo (**A**) y mitocondrias (**B**) analizadas en los dos estudios proteómicos descritos en esta Tesis Doctoral. El análisis de los péptidos se llevó a cabo tal como se describe en la sección de Materiales y Métodos (**apartado 5.5**). En cada carrera de MS se indican las fracciones analizadas (ver **Tabla 4**). *, señala un análisis con un gradiente de cromatografía de 360 min (en lugar de 240 min).

5.6. Búsqueda de espectros de emisión e identificación de péptidos y proteínas

Para la identificación de los péptidos, los espectros de fragmentación se analizaron mediante el motor de búsqueda SEQUEST HT implementado en el programa *Proteome Discoverer 1.4.0.29* (Thermo Scientific). La asignación de secuencias peptídicas se llevó a cabo mediante la comparación de los espectros de fragmentación medidos experimentalmente con las fragmentaciones teóricas calculadas a partir de las proteínas humanas contenidas en la base de datos UniProt (Septiembre 2014, 147 615 entradas) con los siguientes parámetros de búsqueda: hasta 2 sitios de corte fallido en la digestión triptica; tolerancia de 2 y 0,02 Da en las masas del precursor y del espectro de fragmentación, respectivamente; oxidación de metionina (+15,9949 Da) como modificación variable y, en el caso de los péptidos marcados con iTRAQ, modificación fija de +144,1021 Da en lisina y el extremo amino peptídico. En el estudio de tejido las carbamidometilaciones en Cys (+57,0215 Da) fueron consideradas modificaciones fijas, mientras que en el estudio del redoxoma tiólico de mitocondria tanto las carbamidometilaciones como las modificaciones por MMTS (+45,9877 Da) en Cys se consideraron modificaciones variables.

Todos los resultados fueron analizados por el método basado en la razón de probabilidades o *Probability Ratio* (Martinez-Bartolome et al, 2008) y la tasa de error (FDR) de identificación del péptido se calculó teniendo en cuenta los resultados de búsqueda en la base de datos UniProt respecto a los de una base de datos señuelo de acuerdo al método perfeccionado previamente (Navarro & Vazquez, 2009). Para la identificación de péptidos, solo se consideraron aquellos con una FDR menor al 1%.

6. ENSAYOS DE VALIDACIÓN

6.1. Separación de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes e inmunodetección (análisis por WB)

Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral se realizaron diferentes análisis por WB basados en la separación de proteínas en condiciones desnaturizantes (en presencia de SDS) mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) y su posterior transferencia a membrana para la inmunodetección mediante anticuerpos. Dependiendo del tipo de muestra y del marcador analizado, la cantidad de proteína cargada en los geles osciló entre 10-20 µg en el caso de muestras de VAT y de 5-10 µg en el caso de adipocitos aislados y mitocondrias. Como marcador de peso molecular se utilizaron 5 µg de *Precision Plus Protein All Blue* (Cat. 161-063, Bio-Rad Laboratories). En los geles en los que se analizaron extractos mitocondriales también se cargaron 5 µg de mitocondria humana de corazón (*Human heart tissue lysate - mitochondrial extract*, Cat. ab110337, Abcam) como control positivo. Todas las muestras se solubilizaron en tampón RIPA, se mezclaron con 1/5 (v/v) de tampón de carga (Tris-HCl 250 mM pH 6,8, SDS 10%, glicerol 25%, azul de bromofenol 0,04%, DTT 0,5 M) y se hirvieron durante 5 min previamente a cargarse en el gel. Los geles concentradores se prepararon a una concentración estándar del 4% y las proteínas se separaron en geles de acrilamida/bis-acrilamida (37,5:1) (Cat.161-0148, Bio-Rad Laboratories) a diferentes concentraciones (**Tabla 5**) durante 150 min a voltaje constante (90 V). La

transferencia se realizó en cámara fría durante 90 min a amperaje constante (350 mA) utilizándose membranas de nitrocelulosa (Cat. NBA085C001EA, Whatman-Protran). Para asegurar que las proteínas se transfirieron correctamente a las membranas, estas se tiñeron con rojo *Ponceau S* (Cat.6226-79-5, Amresco) al 1% (p/v) en una solución de ácido acético 1% (v/v). Después, las membranas se bloquearon durante 1 h a RT en solución de BSA 5% (p/v) en tampón TBS-T (Tris-HCl 50 mM pH 7,6, NaCl 150 mM, Tween-20 0,1%) y se incubaron ON con los correspondientes anticuerpos primarios (**Tabla 5**). Al día siguiente, las membranas se lavaron 3 veces durante 10 min con tampón TBS-T y se incubaron durante 1 h a RT con los correspondientes anticuerpos secundarios, utilizándose dos métodos de revelado distintos (**Tabla 6**). Para los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano (HRP), las bandas se visualizaron con el reactivo *Amersham ECL Western Blotting Detection Reagent* (Cat. RPN2209, GE Healthcare) y se expusieron a distintos tiempos sobre películas médicas de rayos X (Cat. ENKMV, AGFA). Las densidades ópticas se analizaron dentro del rango lineal con el programa *Image J* (<http://imagej.nih.gov/ij/>). Para los anticuerpos conjugados con distintos fluoróforos las bandas se visualizaron mediante el sistema de imagen infrarroja *Odyssey* (Li-Cor Biosciences) y las imágenes se analizaron con el *Odyssey Application Software* (Li-Cor Biosciences) para obtener las densidades integradas. Las comparaciones entre grupos se realizaron aplicando el test T de *Student* independiente. La significación estadística se asumió a partir de $p < 0,05$.

6.2. Inmunohistoquímica

Las muestras de VAT se fijaron en formaldehído al 10% en PBS durante un máximo de 24 h y se embebieron en parafina en el Servicio de Histología del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” (IIB) utilizando un procesador automático *Leica TP1020* (Leica Biosystems). Las secciones de tejido de 5 μm de grosor se obtuvieron con un microtomo de rotación *Leica RM 2255* (Leica Biosystems).

El protocolo de inmunohistoquímica que se llevó a cabo fue el siguiente: las secciones de tejido se desparafinaron a 60°C durante 30 min, se hidrataron en alcoholes de graduación descendiente y se procedió al desenmascaramiento del antígeno por calor en una solución EDTA 1 mM (pH 8,2). Tras el bloqueo de la peroxidasa endógena, las secciones se bloquearon en suero de caballo (5% en PBS) y se incubaron con anticuerpo primario de conejo 1:200 anti-TOM22 humana (Cat. HPA003037, Sigma-Aldrich) en cámara húmeda ON a 4°C. La tinción del anticuerpo secundario se llevó a cabo con el kit VECTASTAIN ABC (Cat. PK-4000, Vector Laboratories) y se detectó con diaminobencidina (DAB) (Cat. SK-4100, Vector Laboratories). Los lavados se realizaron en una solución TBS al 0,1% de Tritón. Las secciones se contrastaron con hematoxilina de Harris (Cat. 351945S, Prolabo) previamente a la deshidratación y colocación del cubre. El medio de montaje elegido fue *Entellan* (Cat. 107961, Merck) y las secciones se examinaron bajo un microscopio óptico *Nikon Eclipse 90i* (Nikon Instruments Europe). Como control negativo, el procedimiento se realizó en ausencia de anticuerpo primario.

Tabla 5 | Anticuerpos primarios utilizados en los análisis de WB presentados en esta Tesis Doctoral. Para cada una de las proteínas detectadas se muestra la predicción de su peso molecular (en kDa) según la Base de Datos UniProt (Marzo 2017), el rango de concentración de los geles utilizados en la separación mediante SDS-PAGE, así como el origen animal, referencia comercial y dilución de los distintos anticuerpos utilizados. **ECL** (quimioluminiscencia) y **Odyssey** (detección infrarroja) indican los métodos de revelado empleados.

Proteína	kDa	Concentración gel separador	Origen anticuerpo	Casa comercial	Referencia	Dilución	Revelado
ACTB (β-ACTIN)	41,74	7 - 14%	Cabra	Santa Cruz Biotechnology	sc-1616	1:2000	<i>ECL / Odyssey</i>
ATP5A1	59,75	12,5%	Ratón	Abcam	ab14748 *	1:1000	<i>Odyssey</i>
CANX	67,57	8 - 12%	Conejo	Santa Cruz Biotechnology	sc-11397	1:5000	<i>Odyssey</i>
COL6 (COL6A1)	108,53	8 - 10%	Conejo	Abcam	ab199720	1:2000	<i>ECL / Odyssey</i>
COX5B	13,70	12,5 - 14%	Ratón	Santa Cruz Biotechnology	sc-374417	1:1000	<i>ECL</i>
COX6B1	10,19	12,5 - 14%	Ratón	Santa Cruz Biotechnology	sc-393233	1:1000	<i>ECL</i>
CS	51,71	10 - 12%	Conejo	Sigma-Aldrich BD	C5498	1:5000	<i>Odyssey</i>
FASN	273,43	7%	Ratón	Transduction Laboratories	610962	1:2000	<i>Odyssey</i>
FH	54,64	10 - 12%	Ratón	Santa Cruz Biotechnology	sc-100743	1:1000	<i>Odyssey</i>
GAPDH	36,05	10 - 14%	Ratón	Ambion	AM4300	1:10000	<i>Odyssey</i>
GPX1	22,09	10 - 12%	Conejo	Sigma-Aldrich	SAB2700534	1:1000	<i>ECL</i>
GRP78	72,33	10 - 12%	Cabra	Santa Cruz Biotechnology	sc-1050	1:200	<i>ECL</i>
GSTM1	25,71	10 - 12%	Conejo	Santa Cruz Biotechnology	sc-133641	1:250	<i>ECL</i>
H3	15,40	12,5 - 14%	Conejo	Abcam	ab1791	1:10000	<i>ECL</i>
H4	11,37	12,5 - 14%	Conejo	Abcam	ab10158	1:10000	<i>ECL</i>
MAOA	59,68	7 - 12%	Conejo	Santa Cruz Biotechnology	sc-20156	1:2000	<i>Odyssey</i>
MT-CO2	25,57	12,5%	Ratón	Abcam	ab110258 *	1:1000	<i>Odyssey</i>
NDUFA9	42,51	12,5%	Ratón	Abcam	ab14713	1:1000	<i>Odyssey</i>
S100A9	13,24	12,5 - 14%	Cabra	Santa Cruz Biotechnology	sc-8114	1:1000	<i>ECL</i>
SDHA	72,70	10 - 12,5%	Ratón	Abcam	ab14715	1:10000	<i>ECL</i>
SDHB	31,63	12,5%	Ratón	Abcam	ab14714 *	1:1000	<i>Odyssey</i>
SDHC	18,61	12,5 - 14%	Conejo	Abcam	ab155999	1:1000	<i>ECL / Odyssey</i>
SOD2	24,60	10 - 12,5%	Conejo	Enzo Life Sciences	ADI-SOD-111	1:1000	<i>ECL</i>
TFAM	29,10	10 - 12,5%	Conejo	Abcam	ab47517	1:1000	<i>Odyssey</i>
TOM22	15,52	12,5 - 14%	Conejo	Sigma-Aldrich	HPA003037	1:500	<i>ECL</i>
UQCRC2	48,44	12,5%	Ratón	Abcam	ab14745 *	1:1000	<i>Odyssey</i>
VDAC1	30,77	10 - 14%	Ratón	Abcam	ab14734	1:2500	<i>ECL / Odyssey</i>

*, anticuerpos que formaban parte del *Total OXPHOS Human WB Antibody Cocktail* (Cat. ab11041, Abcam).

Tabla 6 | Anticuerpos secundarios utilizados en los análisis de WB presentados en esta Tesis Doctoral. Para cada uno de los anticuerpos se indica: el método de revelado, **ECL** (quimioluminescencia) y **Odyssey** (detección infrarroja); el tipo de anticuerpo, junto con su conjugado asociado; el origen animal del anticuerpo, la referencia comercial y la dilución utilizada en los análisis. **HRP**, peroxidasa de rábano, del inglés *horseradish peroxidase*; **IRDye**, fluoróforos de excitación infrarroja.

Sistema de revelado	Anticuerpo	Conjugado	Origen	Casa comercial	Referencia	Dilución
ECL	Anti-IgG (H+L) de conejo	HRP	Cabra	Nordic Laboratories	6639	1:10000
	Anti-IgG de ratón	HRP	Oveja	Amersham	NXA931	1:10000
	Anti-IgG de cabra	HRP	Burro	Santa Cruz Biotechnology	sc-2020	1:20000
Odyssey	Anti-IgG (H+L) de conejo	IRDye 680LT	Cabra	Li-Cor Biosciences	926-68021	1:10000
	Anti-IgG (H+L) de ratón	IRDye 800CW	Cabra	Li-Cor Biosciences	926-32210	1:10000
	Anti-IgG (H+L) de ratón	IRDye 680	Burro	Li-Cor Biosciences	926-32222	1:10000
	Anti-IgG (H+L) de cabra	IRDye 800CW	Burro	Li-Cor Biosciences	926-32214	1:10000

6.2.1. Análisis morfométrico mediante el programa *Adiposoft*

Para analizar el número y tamaño de los adipocitos en las secciones de VAT, se recurrió al programa *Adiposoft* (Galarraga et al, 2012). Se utilizaron cortes de tejido de 5 µm de grosor teñidos con hematoxilina-eosina según los procedimientos convencionales. Las secciones histológicas se evaluaron bajo un microscopio *Nikon Eclipse 90i* (Nikon Instruments Europe) a un aumento de 40X y 100X, tomándose imágenes de manera aleatoria. El método de estimación se utilizó en modo automático sin hacer correcciones manuales en la asignación de los adipocitos. El umbral de tamaño mínimo y máximo se estableció en 40 µm y 175 µm, respectivamente. Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante la aplicación del test T de *Student* independiente. La significación estadística se asumió a partir de $p < 0,05$.

6.3. Ensayos de inmunocaptura y actividad enzimática

Las mitocondrias se aislaron a partir de adipocitos humanos usando el protocolo de Abcam (**apartado 3.2.2 de Materiales y Métodos**).

La actividad del complejo IV (citocromo c oxidasa) se estimó mediante el uso de un ensayo de inmunocaptura en placa (Cat. ab109909, Abcam) adaptando las instrucciones del fabricante a nuestra muestra. Brevemente, las suspensiones de mitocondria fueron suavemente digeridas con la solución suministrada por el kit (dilución 1/10) durante 30 min en hielo. Después, las muestras se centrifugaron a 16 000 xg durante 20 min y el sobrenadante se diluyó en el tampón 1 proporcionado por el kit. La muestra

diluida se incubó en la placa durante 3 h a RT, de manera que el complejo IV fue inmovilizado gracias a los anticuerpos monoclonales que recubrían la placa. Después de varios lavados, el complejo antígeno-anticuerpo se incubó con la solución de ensayo que contenía el citocromo c reducido y la actividad enzimática del complejo IV se estimó en función de los cambios en la densidad óptica (OD) a 550 nm producidos por la oxidación del citocromo c. Las medidas se realizaron en modo cinético incubando la placa a 30°C (sin agitación) y midiendo cada 2 min y 30 s durante 120 min en un aparato *Infinite M1000* (TECAN Trading AG, Switzerland). Se utilizó mitocondria bovina de corazón (*Bovine Heart Mitochondria*, Cat. ab110338, Abcam) como control positivo. Como control negativo, el experimento se realizó en ausencia de sustrato (citocromo c reducido). Todas las muestras se midieron por triplicado y la actividad para cada paciente se calculó como la media de las diferencias entre dos puntos dentro del rango lineal normalizado por la cantidad de proteína (ΔOD 550 nm/min/mg proteína). Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante la aplicación del test T de *Student* independiente. La significación estadística se asumió a partir de $p < 0,05$.

6.4. Análisis de extractos mitocondriales en condiciones nativas

Se utilizaron los precipitados de mitocondrias aislados a partir de adipocitos humanos mediante el protocolo de Abcam (**apartado 3.2.2 de Materiales y Métodos**). Los ensayos se realizaron en la Unidad de Proteómica del Instituto de Investigación Hospital Universitario 12 de Octubre (i+12, Madrid) utilizando los protocolos previamente descritos (Moreno-Lastres et al, 2012; Mourier et al, 2014).

Para extraer las proteínas en condiciones nativas, los precipitados se solubilizaron en 30-100 μ L de tampón Bis-Tris 50 mM pH 7,0, ácido aminocaproico 1,5 M y las mitocondrias se trataron con una proporción de digitonina de 4 g/g (4 g de digitonina por g de proteína). Las muestras solubilizadas se incubaron en hielo durante 20 min, se centrifugaron a 16 000 xg durante 30 min a 4°C y el sobrenadante se combinó con tampón de carga (Bis-Tris 50 mM, ácido aminocaproico 750 mM, EDTA 0,5 mM, *Serva Blue G-250* al 5%).

6.4.1. Análisis 1D BN-PAGE y 2D BN-SDS/PAGE

Para realizar la electroforesis en la primera dimensión (1D) se utilizaron geles *Native PAGE Novex 3-12% Bis-Tris* (Cat. BN1003BOX, Invitrogen) y se cargaron con 30 μ g de proteína mitocondrial. Parte de estos geles 1D-BN-PAGE se utilizaron para analizar el ensamblaje de los supercomplejos en su conformación nativa directamente mediante inmunodetección. Otros geles se procesaron en una segunda dimensión (2D) en condiciones desnaturizantes (SDS/PAGE). Para ello, cada banda del gel de 1D-BN-PAGE se cortó con un bisturí, se incubó durante una hora con una solución desnaturizante (SDS 1%, β -mercaptoetanol 1%) y se rotó 90° en un cristal procediendo a la segunda electroforesis.

Para llevar a cabo la inmunodetección tanto en 1D como en 2D, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa a un amperaje constante de 1,3 A durante 10 min y se incubaron con los siguientes anticuerpos primarios: anti-COX5A (subunidad 5A de la citocromo c oxidasa) en dilución

1:1000 (ab110262, Abcam), anti-NDUFA9 (subunidad 9A de la NADH deshidrogenasa) en dilución 1:1000 (ab14713, Abcam) y anti-VDAC1 (canal de intercambio aniónico dependiente de voltaje 1) en dilución 1:2000 (ab14734, Abcam) todos hechos en ratón. Posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con HRP y las bandas se visualizaron con el *Cheluminare-HRP PicoDetect Kit for Western Blotting* (Cat. A3417, Panreac AppliChem).

6.4.2. Ensayos de actividad en gel del complejo I mitocondrial

Para realizar los ensayos de actividad en gel (IGA) se realizaron geles duplicados cargados con 60 µg de proteína mitocondrial. Una vez completado el BN-PAGE, los geles se incubaron entre 2-4 h a RT en una solución de Tris-HCl 2 mM, pH 7,4, NADH 0,1 mg/mL y azul de nitrotetrazolio 2,5 mg/mL. Después de la incubación, los geles se lavaron en agua destilada y se escanearon en un aparato *ImageScanner III* (GE Healthcare).

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La descripción de resultados que implicaban variables continuas se expresaron como la media \pm desviación estándar (DE). Los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante el programa SPSS (*Statistical Package for Social Science*, v.22, IBM SPSS Corporation) y *Microsoft Office Excel 2016* (Microsoft Corporation). El análisis de la varianza simple (ANOVA), con corrección *post hoc* de Bonferroni, se utilizó para comparar las variables clínicas y antropométricas de los pacientes. La relación entre variables continuas se evaluó mediante el test de correlación de Pearson. Las comparaciones directas entre dos grupos en los ensayos de validación se realizaron con la aplicación del test T de *Student* independiente. La significación estadística se estableció a partir de $p < 0,05$ en todos los casos.

7.1. **Aplicación del modelo WSPP para la cuantificación de péptidos y proteínas diferencialmente abundantes**

Las intensidades de los iones reporteros derivados del marcaje iTRAQ fueron cuantificadas a partir de los espectros de fragmentación gracias al programa QuiXoT (Lopez-Ferrer et al, 2006; Ramos-Fernandez et al, 2007). QuiXoT proporciona los datos de entrada para el modelo WSPP (Navarro et al, 2014), mediante el cual se estiman las abundancias de los péptidos y proteínas de los que derivaron esos reporteros. El modelo WSPP palia en parte los problemas estadísticos asociados a la cuantificación de proteínas a partir de péptidos marcados con iTRAQ (Luo & Zhao, 2012), ya que considera que las cuantificaciones no tienen la misma precisión en todos los niveles y por ello descompone los diferentes componentes de la varianza, teniendo en cuenta la estructura altamente desequilibrada de este tipo de datos (Navarro et al, 2014). Para ello, el modelo WSPP integra la información cuantitativa a varios niveles (por ejemplo, de espectro a péptido y de péptido a proteína) teniendo en cuenta las fuentes de error correspondientes a cada uno de los niveles de cuantificación, que son: i) el error cometido durante la medida en el espectrómetro de masas; ii) el error con que diferentes péptidos cuantifican la proteína de la que se

generan; y iii) la dispersión con que cada una de las proteínas se desvía del valor promedio esperado. Este tipo de errores y varianzas asociadas son estimados mediante diferentes parámetros en los tres niveles (espectro, péptido y proteína) que, en última instancia, permiten el cálculo de un valor Z (Navarro et al, 2014). Ese valor Z se refiere al ratio logarítmico estandarizado en términos de desviación estándar que estima la abundancia de péptidos (Z_p) y proteínas (Z_q) entre las dos condiciones a comparar. En el presente trabajo de Tesis Doctoral el umbral para asignar las proteínas con abundancia diferencial se estableció en $|Z_q| \geq 2$ (correspondiente a un $p < 0,05$).

7.1.1. Análisis de los cambios a nivel de péptido en la estrategia redox

La cuantificación correspondiente al marcaje diferencial de Cys basado en la tecnología GELSILOX (Martinez-Acedo et al, 2012) (estudio del proteoma mitocondrial) requiere la realización de dos análisis estadísticos. En un primer análisis, se excluyen los péptidos con residuos de Cys en su secuencia, y se utiliza el resto de los péptidos (sin residuos de Cys en su secuencia o péptidos nonCys) para calcular las varianzas a nivel de espectro, de péptido y de proteína, así como para determinar las proteínas con cambios en su abundancia estadísticamente significativos (en base al Z_q). Después, se realiza un segundo análisis estadístico que incluye la población entera de péptidos del proteoma, Cys y nonCys, donde se utilizan las varianzas calculadas en el primer análisis para caracterizar los péptidos Cys que se desvían de la distribución esperada para los péptidos pertenecientes a cada proteína. De esta manera, se evitan cálculos sesgados que reflejen los cambios en la abundancia de las proteínas de las que se originaron estos péptidos, obteniéndose la correspondiente \log_2 ratio estandarizada a nivel de péptido, Z_p . En este trabajo, el umbral para distinguir los péptidos diferencialmente abundantes se estableció en $|Z_p| \geq 2$.

7.2. Aplicación del modelo SBT para la búsqueda de cambios proteicos coordinados

Se utilizó un algoritmo de Biología de Sistemas, basado en el modelo WSPP, que permite la detección y el análisis de cambios proteicos coordinados partiendo de datos de proteómica cuantitativa (García-Marques et al, 2016). Este modelo integra a un nivel superior la información de conjuntos de proteínas creados a partir de categorías funcionales de manera que, al igual que se hacía a nivel de péptido o proteína, se obtiene una relación o ratio logarítmico estandarizado (Z_c) para cada función proteica. Este ratio pondera el conjunto de los cambios de cada una de las proteínas pertenecientes a un grupo o categoría funcional, determinando si coordinadamente ese conjunto de proteínas se comporta diferencialmente entre dos condiciones. En el presente trabajo de Tesis Doctoral, las categorías funcionales se consideraron significativamente diferenciales cuando contenían 5 o más componentes proteicos con $FDR < 0,05$. Adicionalmente, se realizaron análisis de agrupamiento o *clustering* en base a la frecuencia de términos proteicos compartidos entre las categorías funcionales reguladas.

8. BASES DE DATOS Y OTROS RECURSOS INFORMÁTICOS

Para la aplicación del modelo SBT, se construyó un archivo de relaciones proteína-categoría que contuviera anotaciones ontológicas con relevancia en el tejido adiposo y obesidad. El archivo final se obtuvo a partir de la base de datos DAVID (Huang da et al, 2009a) y contenía aproximadamente $2,3 \cdot 10^6$ relaciones proteína-categoría con información proveniente de: OMIM (n= 74 246 anotaciones); KEGG (n= 118 854); PANTHER (n= 40 503); COG Ontology (n= 11 133); y los términos GO (*Gene Ontology*) FAT de procesos biológicos (BP, n= 1458371) y componentes celulares (CC, n= 553 965), los cuales evitan términos redundantes de categorías parentales demasiado amplias.

Los términos de proteínas mitocondriales se obtuvieron a partir de aquellos incluidos en la anotación GO *Mitochondrion* (GO:0005739, <http://www.geneontology.org/>) así como de la base de datos *Human MitoCarta v2.0* (Calvo et al, 2016).

Los análisis de enriquecimiento de listas de proteínas se realizaron con el programa facilitado por DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>) (Huang da et al, 2009b) y los análisis de redes y agrupación de proteínas se llevaron a cabo mediante la aplicación de STRING v10.0 (<http://string-db.org/>) (Szklarczyk et al, 2015).

resultados y
discusión.

*“Creo que en la discusión de los problemas naturales, deberíamos comenzar no con las escrituras,
sino con experimentos y demostraciones.”*

Galileo Galilei (1564 - 1642)

1. ANÁLISIS DEL PROTEOMA DEL VAT EN OBESIDAD

La acumulación excesiva de VAT, también denominada “obesidad visceral”, se relaciona directamente con el desarrollo de enfermedades metabólicas como DM2 o ECV (Neeland et al, 2012). El envejecimiento influye en la acumulación de tejido adiposo aumentando significativamente su masa total, redistribuyendo la grasa corporal con un aumento del VAT frente al SAT, así como aumentando el depósito de la grasa ectópica (Demerath et al, 2007; Graner et al, 2013). Por ello desde hace tiempo, el envejecimiento se conoce como un factor de riesgo independiente en el desarrollo de obesidad y de DM2 (Barzilai et al, 2012; Shimokata et al, 1989). Paralelamente, las diferencias entre hombres y mujeres en la distribución del tejido adiposo han sido ampliamente establecidas (Karastergiou et al, 2012; Krotkiewski et al, 1983). En general, los hombres tienen un fenotipo obeso más perjudicial que las mujeres debido principalmente a la acumulación de grasa en la región abdominal (Camhi et al, 2011; Geer & Shen, 2009). No obstante, cabe destacar que el efecto perjudicial del envejecimiento se acentúa en las mujeres respecto a los hombres con el paso del tiempo. Las mujeres sufren una significativa redistribución del tejido adiposo al acercarse a la menopausia, de manera que la grasa comienza a acumularse principalmente en la zona abdominal en detrimento de las zonas periféricas como los glúteos (Kanaley et al, 2001). Esta redistribución se traduce en un mayor riesgo metabólico y cardiovascular que puede pasar de ser inferior en mujeres pre-menopáusicas a ser superior en post-menopáusicas respecto a los hombres (Regitz-Zagrosek et al, 2006).

Para el estudio proteómico, se escogieron un total de 16 muestras de pacientes obesos mórbidos ($\text{IMC} \geq 40 \text{ kg/m}^2$) que compartían las características clínicas más homogéneas, tal y como se describe en el apartado de Material y Métodos (sección 2). Se distinguieron dos grupos principales: pacientes con DM2 (obesos diabéticos, $n=8$) y pacientes sin DM2 u otras comorbilidades asociadas a la obesidad (obesos no diabéticos, $n=8$). Cada uno de estos grupos se dividió en dos subgrupos teniendo en consideración el género (mujeres obesas diabéticas, $n=4$; hombres obesos diabéticos, $n=4$) y el rango de edad (mujeres obesas no diabéticas mayores de 45 años, $n=4$; mujeres obesas no diabéticas menores de 35 años, $n=4$). Todos nuestros grupos presentaron un grado de obesidad visceral similar, representado por un $\text{IMC} > 40$ y un perímetro de la cintura marcadamente superior a 80 cm en las mujeres y a 94 cm en los hombres (**Tabla 3**). Todas las obesas no diabéticas exhibieron niveles controlados de glucemia (glucosa en ayunas $\leq 7 \text{ mmol/L}$ y $\text{HbA1c} \geq 6,5 \%$) y, en el caso de los pacientes diabéticos, no se apreciaron diferencias en el grado de control de la DM2 entre hombres y mujeres. En cuanto a la edad de los pacientes, solo los grupos implicados en el estudio diferencial de envejecimiento presentaron diferencias significativas. A este respecto, es preciso destacar que las mujeres de mayor edad manifestaron una ligera tendencia a tener un peor perfil lipídico que las mujeres más jóvenes (**Tabla 3**). Estas diferencias responden al aumento que sufren estos parámetros con el envejecimiento (Heiss et al, 1980; Heitmann, 1992), unido a la ausencia de medicación en estas pacientes. De hecho, el tratamiento

con fármacos provocó la mejora de los parámetros lipídicos en los grupos de hombres y mujeres diabéticos, llegando a ser incluso mejores que los de las pacientes más jóvenes (**Tabla 3**).

Con el fin de profundizar en el desarrollo de la DM2 en obesidad y la influencia del envejecimiento y el dimorfismo sexual en el tejido adiposo humano, recurrimos a una estrategia no dirigida que combinó una plataforma proteómica de alta resolución, iTRAQ y HPLC-MS, junto con herramientas de Biología de Sistemas. Así, dentro del mismo experimento iTRAQ/HPLC-MS, la comparación entre los distintos grupos de pacientes generó 3 estudios diferenciales independientes (**Figura 7**). De esta manera, nuestro diseño experimental permitió no solo una evaluación sólida de los cambios en la abundancia de proteínas, sino también reducir considerablemente la cantidad de muestra utilizada y el tiempo de adquisición de datos en comparación con otras alternativas. Además, la aplicación de análisis de Biología de Sistemas permitió valorar por primera vez los cambios globales del VAT humano asociados a la edad, la DM2 y el género lo de los pacientes (Gomez-Serrano et al, 2016).

1.1. Identificación del proteoma del VAT y análisis de proteínas individuales diferencialmente abundantes en obesidad

Debido al diseño no dirigido de este estudio, una de las partes más interesantes del trabajo estaba constituida por una primera etapa de identificación de proteínas con la que definiríamos el proteoma del VAT. Bajo una FDR del 1% se identificaron 14 118 péptidos únicos (**Tabla S1**) asignados a 2 525 proteínas, que estaban codificadas por un total de 2 329 genes humanos (**Tabla S2**). Nuestro número de proteínas fue comparable al descrito por Kim y col. (Kim et al, 2014), que constituía la descripción del proteoma del VAT más exhaustiva hasta esa fecha (**Figura 13**).

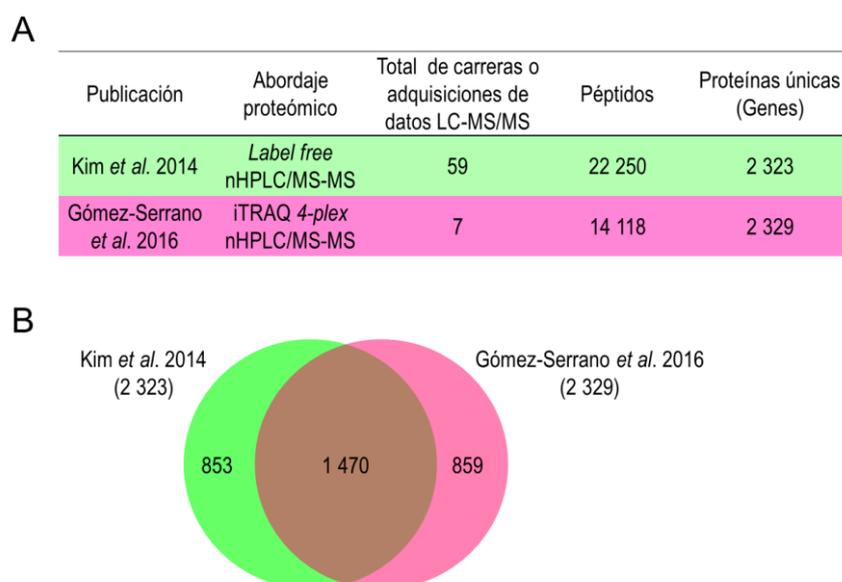


Figura 13 | Cobertura del proteoma del VAT. (A) Comparación del estudio proteómico del VAT descrito en este trabajo de Tesis Doctoral (Gomez-Serrano et al, 2016) frente al del estudio de Kim y col. (Kim et al, 2014). El estudio

de Kim y col. analizó la aparición temprana de DM2 en pacientes no obesos, obteniendo la descripción del proteoma del VAT más detallada hasta esa fecha (2014). A pesar de las diferencias metodológicas, ambos estudios detectaron la expresión de un número similar de genes en el VAT. **(B)** Diagrama de Venn que muestra el número de proteínas descritas en cada una de las publicaciones. Se identificaron un total de 1 470 productos génicos en ambos estudios (aproximadamente el 63%).

En ese estudio los autores detectaron la expresión de 2 323 genes mediante un abordaje proteómico sin marcaje (*label free*), necesitando 59 adquisiciones MS para ello. Por el contrario, en nuestro estudio fueron suficientes 7 carreras MS para alcanzar una cobertura similar (correspondiente a 2 329 proteínas únicas) **(Figura 13A)**. Además, aproximadamente el 63% de los productos génicos detectados fueron idénticos en ambos estudios (1 470 proteínas) **(Figura 13B)**. La simplicidad en la adquisición de los datos así como la minimización del gasto de muestra, señalaron las ventajas del abordaje iTRAQ/HPLC-MS escogido en nuestro caso frente al de Kim y col.

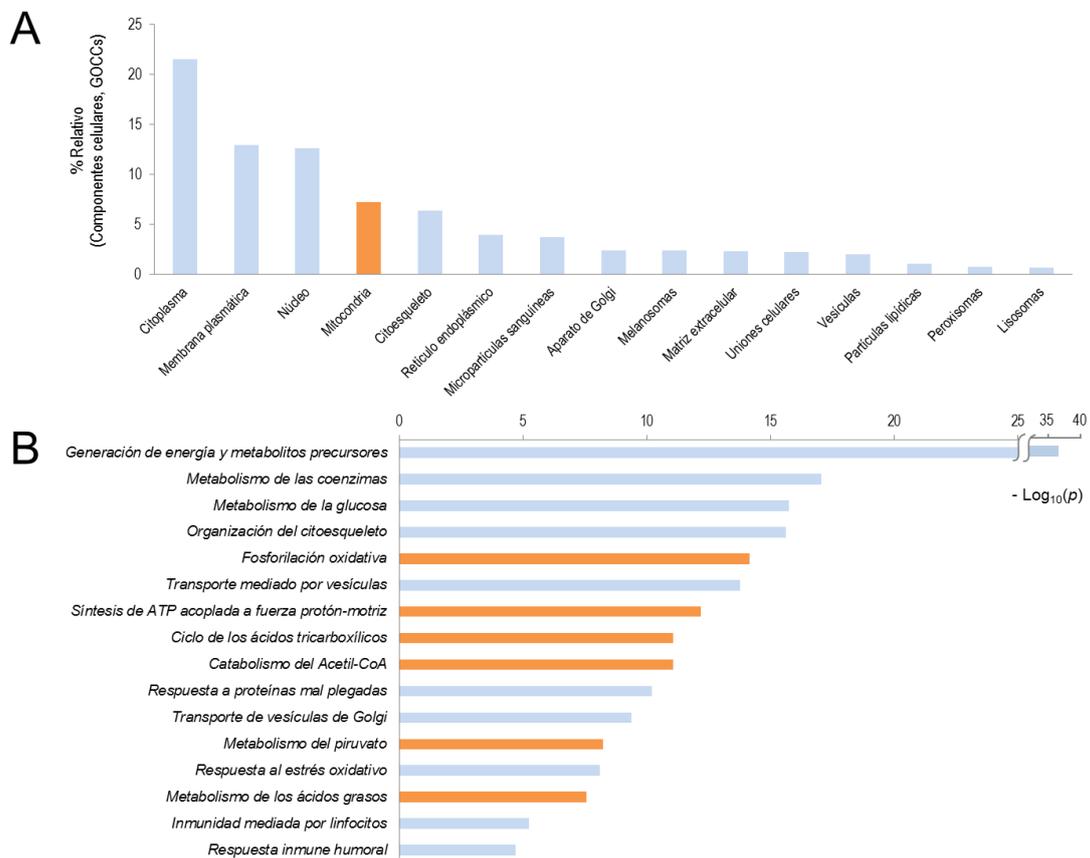


Figura 14 | Funciones destacadas en el proteoma del VAT de pacientes obesos. (A) Proporción relativa de los principales componentes celulares (categorías GOCCs). El cálculo se realizó en función al número de proteínas identificadas para cada categoría respecto al total de identificaciones. **(B)** Análisis de enriquecimiento de los procesos biológicos (GOBPs). Las barras representan el $-\text{Log}_{10}(p)$, donde p se refiere al p valor obtenido para el enriquecimiento. Se muestran los GOBPs más representativos. La **Tabla S2** contiene el total de GOBPs

enriquecidos con $p < 0,05$. Las categorías relacionadas con la mitocondria se encuentran destacadas en naranja. Figura adaptada de (Gomez-Serrano et al, 2016).

El análisis de los componentes celulares de GO (GOCCs) a los que pertenecían las proteínas identificadas en nuestro estudio, manifestó que los principales compartimentos subcelulares representados en el VAT eran el citoplasma (22%), la membrana plasmática (13%), el núcleo (13%) y la mitocondria (7%), con contribuciones importantes también del RE (4%) y el aparato de Golgi (2%) (**Figura 14A**). Para comprobar la relevancia biológica de las proteínas implicadas, se llevaron a cabo análisis de enriquecimiento mediante el *software* DAVID (Huang et al, 2009b). Los procesos biológicos GO (GOBPs) significativamente enriquecidos en el proteoma del VAT comprendían funciones bien conocidas del tejido adiposo tales como la *generación de metabolitos precursores y energía* o *el metabolismo de la glucosa y ácidos grasos*, y otros fenómenos relacionados con la obesidad como la *respuesta al estrés oxidativo* o *la respuesta a proteínas mal plegadas (Response to unfolded protein)* (**Figura 14B, Tabla S3**), en consonancia con estudios proteómicos previos en VAT humano (Kim et al, 2014; Perez-Perez et al, 2012a). Las principales rutas metabólicas mitocondriales también estaban enriquecidas de manera significativa, lo que subraya la importancia de este orgánulo en el tejido adiposo.

1.1.1. Cuantificación de los cambios en la abundancia de proteínas individuales

El análisis cuantitativo de los datos proteómicos se realizó bajo el modelo estadístico WSPP (Navarro et al, 2014). Antes de la cuantificación, las proteínas plasmáticas y las citoqueratinas epidérmicas identificadas se excluyeron del análisis para evitar una información sesgada debida, o bien a diferencias en la contribución del plasma entre las distintas muestras de pacientes, o bien a diferencias en la posible contaminación durante la manipulación de las mismas. De esta manera se aseguró trabajar bajo una distribución normal de los datos, que finalmente contenían un total de 12 824 péptidos únicos correspondientes a 2 371 proteínas (codificadas por un total de 2 245 genes). Estas proteínas se cuantificaron en los grupos de pacientes, cuya comparación dio lugar a los tres estudios diferenciales que se abordan en esta Tesis Doctoral (edad, DM2 y género) (**Figura 15**). La distribución normal de los datos se comprobó mediante el análisis del ratio logarítmico (en base 2) de la media corregida para cada una de las proteínas (valor $X'q$) respecto a su peso estadístico (valor Wq) en cada una de las comparaciones (**Figura 16**). A partir de estos valores, el modelo define una variable estandarizada a nivel de proteína (el valor Zq) que es el ratio logarítmico (en base 2) de la media corregida expresada en unidades de desviación estándar (Navarro et al, 2014). En esta Tesis Doctoral, las proteínas con $|Zq| \geq 2$ (correspondientes a $p < 0,05$) se consideraron como proteínas diferencialmente abundantes (DAPs) en cada comparación. La **Tabla S4** recoge los valores estadísticos $X'q$, Wq y Zq de las 2 371 proteínas en cada comparación.

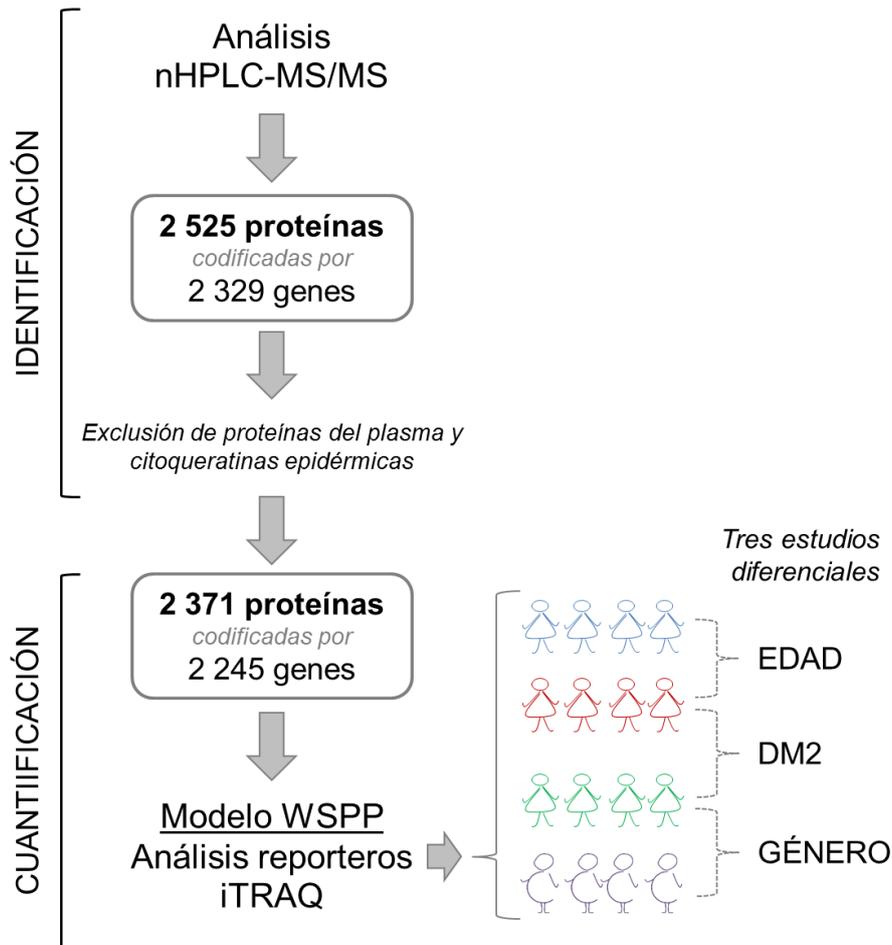


Figura 15 | Flujo de trabajo (workflow) seguido en el análisis del proteoma del VAT. El análisis que se realizó en este trabajo consta de dos etapas bien diferenciadas: una primera de identificación (por LC-MS) y una segunda de cuantificación relativa (derivada de la metodología iTRAQ). Nótese que el número de proteínas siempre es ligeramente superior al de sus correspondientes genes debido a la identificación/cuantificación de distintas isoformas proteicas codificadas por un mismo gen.

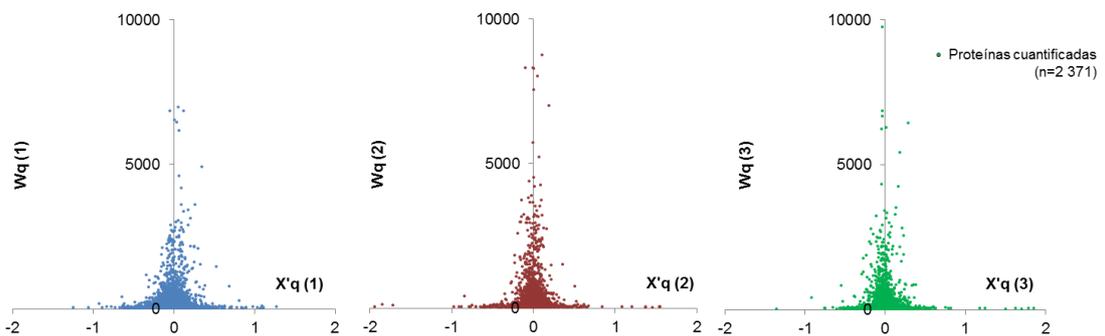


Figura 16 | Distribución normal de los datos de cuantificación del proteoma del VAT. Gráficos de puntos que muestran los valores $X'q$ (\log_2 de la media corregida para cada proteína) respecto a Wq (peso estadístico de la proteína) en cada una de las comparaciones: edad (1, puntos azules); DM2 (2, puntos rojos) y género (3, puntos verdes). El modelo WSP trabaja bajo la hipótesis de normalidad, de manera que los datos deben ajustarse a una distribución gaussiana. Figura tomada de (Gomez-Serrano et al, 2016).

De acuerdo al criterio escogido, los resultados mostraron que en el estudio comparativo de edad 255 proteínas estaban diferencialmente reguladas (126 más abundantes y 129 menos abundantes) en obesas no diabéticas de mayor edad (media 51 años) respecto a las más jóvenes (media 32 años); en el caso del estudio de DM2, 203 proteínas mostraron diferencias significativas en obesas diabéticas vs. no diabéticas (98 mayor abundancia y 105 menor abundancia); y, en el caso del estudio de género, se detectaron un total de 246 DAPs de las cuales 134 aumentaron en mujeres diabéticas y 112 en hombres diabéticos (**Figura 17A**). Entre el 15 y el 33% de las DAPs eran comunes entre las distintas comparaciones (**Figura 17B**), lo que remarcó la conexión que existe entre el envejecimiento y la DM2 así como la influencia del género sobre estos fenómenos. De hecho, el mayor grado de coincidencia entre DAPs existía entre la DM2 y el género (alrededor del 33%), lo que sugiere un gran impacto del dimorfismo sexual sobre el fenotipo diabético en el tejido adiposo.

Por otro lado, entre 100 y 150 DAPs se encontraron alteradas de forma exclusiva para cada una de las comparaciones (**Figura 17C**). Dado que este número de DAPs era relativamente elevado para que fuera factible el análisis individual de cada una de las proteínas, se procedió al análisis de enriquecimiento de estas listas mediante el *software* DAVID. Para cada comparación se estudiaron las listas de proteínas con mayor y menor abundancia por separado, y se determinaron significativamente representadas aquellas categorías funcionales con $p < 0,05$ (**Tablas S5-10**).

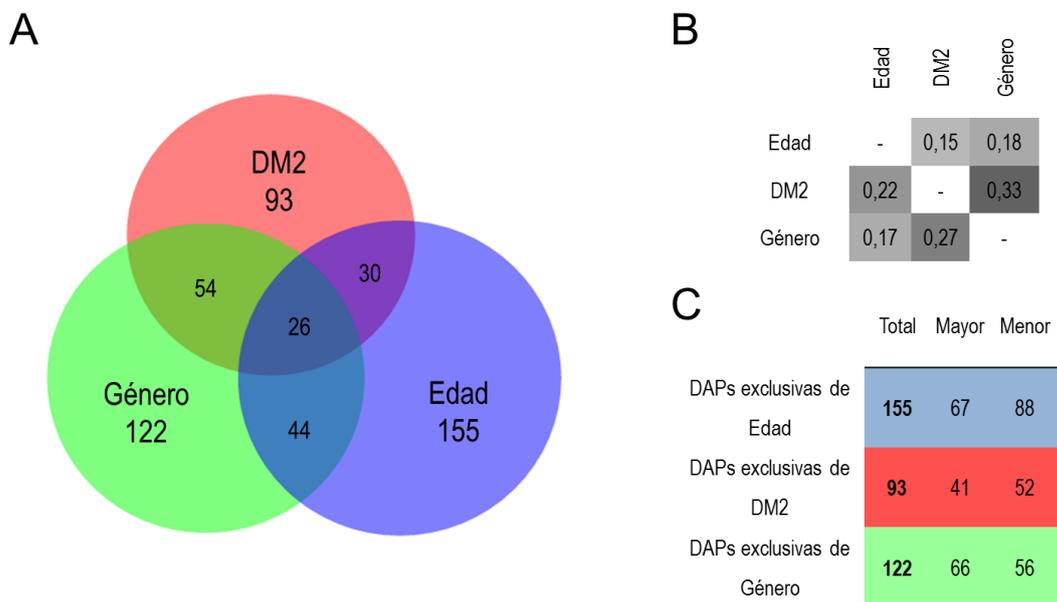


Figura 17 | Cambios en la abundancia de proteínas individuales en el VAT de pacientes obesos. (A) Diagrama de Venn que muestra el número de DAPs en cada una de las comparaciones y las distintas coincidencias. La evaluación y visualización de las listas de proteínas se realizó mediante diagramas de área proporcional a través de la aplicación web Bio-Venn (Hulsen et al, 2008). **(B)** Grado de coincidencia de DAPs entre las distintas comparaciones. **(C)** Número de DAPs encontradas exclusivamente en cada comparación. Se indica también el número de proteínas con mayor y menor abundancia. Figura adaptada de (Gomez-Serrano et al, 2016).

1.1.2. Proteínas alteradas en el estudio de edad

En las obesas no diabéticas mayores de 45 años vs. menores de 35 años, las categorías que fueron significativamente más abundantes comprendían proteínas de la *matriz extracelular* (**Tabla S5**), tales como la metaloproteínasa de la matriz 9 (MMP9), subunidades de colágeno o laminina (LAMB2) (**Tabla 7**). La MMP9 es una enzima proteolítica que actúa principalmente sobre moléculas de la ECM como el colágeno, favoreciendo el reciclaje del tejido conectivo y vascular (Woessner, 1991) y la infiltración de poblaciones linfocitarias en ciertos tejidos (Bekes et al, 2011; Yabluchanskiy et al, 2013). La alteración de MMPs con el envejecimiento podría contribuir a la remodelación y expansión del tejido adiposo (Christiaens & Lijnen, 2006), favoreciendo la inflamación (Strissel et al, 2007) y el desarrollo de patologías inflamatorias como la artritis, la DM2 o el cáncer (Halade et al, 2013). Las subunidades del colágeno y la laminina forman parte del componente estructural de la ECM (Divoux & Clement, 2011). El colágeno tipo VI (COL6) se ha relacionado con un mayor desarrollo de fibrosis (Buechler et al, 2015) así como con mayor IMC, grasa visceral e inflamación en humanos (Pasarica et al, 2009). Además, el modelo de ratón deficiente para COL6 mostró mejoras en el metabolismo lipídico y de la glucosa, aunque paradójicamente se acompañaba de un incremento del tamaño de los adipocitos (Khan et al, 2009). Para confirmar que el envejecimiento se acompañaba de una acumulación de proteínas de la ECM con impacto negativo sobre el tejido adiposo, se escogió COL6 como proteína representativa. El análisis mediante WB de un conjunto independiente de 16 muestras de VAT confirmó el aumento de COL6 en pacientes de mayor edad (**Figura 18**).

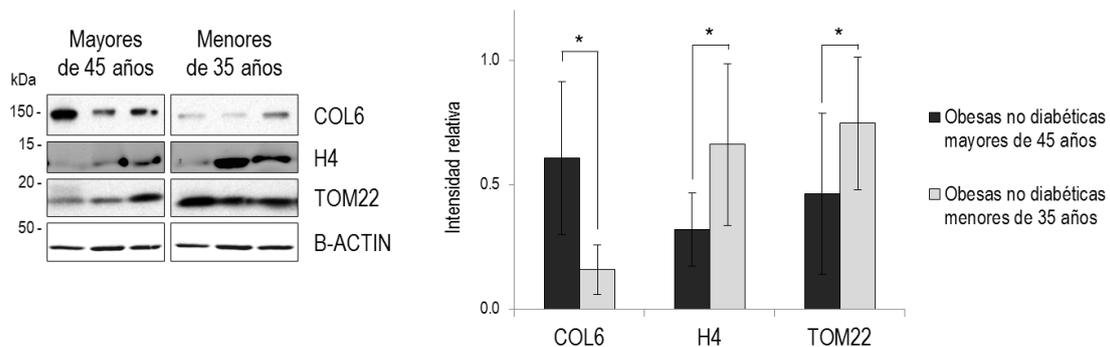


Figura 18 | Validación de DAPs mediante WB en el estudio diferencial de edad del VAT. Imágenes representativas de marcadores seleccionados que se analizaron mediante WB en un conjunto independiente de muestras de VAT procedente de pacientes no diabéticas mayores de 45 años (n=8) y menores de 35 años (n=8). Los resultados se normalizaron con los datos obtenidos para la β -Actina. Los gráficos de barras muestran los valores de intensidad relativa como medias \pm DE obtenidos después de la densitometría de las bandas. La significación estadística se estableció en $p < 0,05$. **kDa**, peso molecular de las distintas bandas; *, $p < 0,05$. Figura adaptada de (Gomez-Serrano et al, 2016).

Tabla 7 | Análisis de enriquecimiento funcional de las DAPs que se encontraron exclusivamente en la comparación de edad. Se muestran algunas categorías representativas con sus proteínas correspondientes, indicándose el código de acceso de UniProt así como el nombre de la proteína y su símbolo. El valor Zq asociado a cada una de las DAPs aparece en una escala de color amarillo-morado indicando mayor o menor abundancia con la edad, respectivamente. Las categorías funcionales se obtuvieron con el *software* DAVID (Huang da et al, 2009b). Las **Tablas S5 y S6** contienen el listado completo de categorías enriquecidas. Tabla modificada de (Gomez-Serrano et al, 2016).

Categoría	p valor	UniProt	Nombre de la proteína	Símbolo	Zq
<i>Extracellular matrix</i> (GO:0031012)	0,00	P14780	Matrix metalloproteinase-9	MMP9	4,25
		Q12805	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1	EFEMP1	3,54
		P55268	Laminin subunit beta-2	LAMB2	2,90
		P51888	Prolargin	PRELP	2,64
		P02462	Collagen alpha-1(IV) chain	COL4A1	2,45
		P12110	Collagen alpha-2(VI) chain	COL6A2	2,37
<i>Chromatin assembly or disassembly</i> (GO:0006333)	0,00	P16401	Histone H1.5	HIST1H1B	-2,16
		P62805	Histone H4	HIST1H4A	-2,69
		Q02539	Histone H1.1	HIST1H1A	-3,04
<i>Mitochondrial part</i> (GO:0044429)	0,04	Q8NC60	Nitric oxide-associated protein 1	NOA1	-2,20
		P06241	Tyrosine-protein kinase Fyn	FYN	-2,21
		P24310	Cytochrome c oxidase subunit 7A1, mitochondrial	COX7A1	-2,22
		Q9NS69	Mitochondrial import receptor subunit TOM22 homolog	TOMM22	-2,27
		P51970	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 8	NDUFA8	-2,28
		P53007	Tricarboxylate transport protein, mitochondrial	SLC25A1	-2,42

Las categorías funcionales sobre-representadas en el conjunto de DAPs que disminuían su abundancia con la edad estaban implicadas en la *transcripción* y la *traducción*, incluyendo proteínas ribosomales, histonas (principalmente H1 y H4) y varias ribonucleoproteínas. Otras funciones disminuidas estaban relacionadas con la *mitocondria*, implicando fundamentalmente a la *organización de la membrana* (**Tabla S6**). La disminución de H4 en pacientes de mayor edad se validó independientemente mediante WB (**Figura 18**). Entre las proteínas mitocondriales disminuidas destacaron el transportador mitocondrial de tricarboxilato (SLC25A1) o TOM22 (**Tabla 7**), localizados en las membranas mitocondriales interna y externa, respectivamente. TOM22 se analizó en un conjunto independiente de muestras de VAT mediante WB (**Figura 18**) e IHC (**Figura 19**), mostrando diferencias significativas entre pacientes de mayor y menor edad. En conjunto, nuestros resultados de proteómica cuantitativa indicaron que con la progresión de la edad existen alteraciones de los procesos de traducción y transcripción junto con alteraciones de la ECM y la mitocondria en el VAT, en consonancia a estudios previos (Khan et al, 2009; Lopez-Otin et al, 2013).

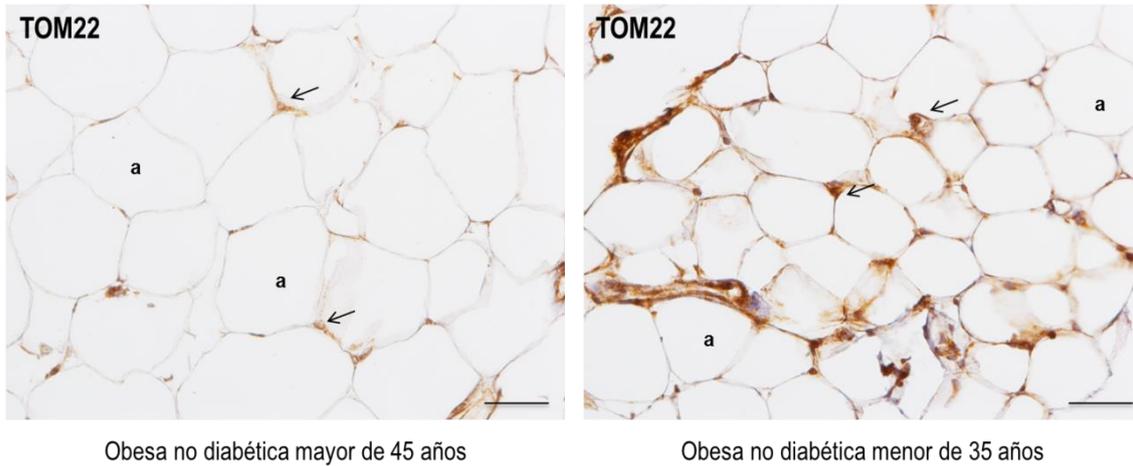


Figura 19 | Validación de la proteína TOM22 como DAP en el estudio diferencial de edad mediante IHC. Inmunodetección de TOM22 en muestras de VAT procedente de pacientes no diabéticos mayores de 45 años (n=4) y menores de 35 años (n=4). Imágenes representativas donde se muestra la tinción de TOM22 (en marrón) principalmente alrededor de los núcleos donde se localizan las mitocondrias (flechas). Aumento 200X bajo el microscopio Nikon Eclipse 90i. a, adipocito. Escala, 50 μ m. Figura adaptada de (Gomez-Serrano et al, 2016).

1.1.3. Proteínas alteradas en el estudio de DM2

Las categorías que fueron significativamente más abundantes en pacientes diabéticas frente a no diabéticas envolvían funciones relacionadas principalmente con *unión a calcio*, *respuesta inmune e inflamación* (**Tabla S7**), incluyendo a las proteínas S100 de unión a calcio A8 y A9 (S100A8 y S100A9) y la trombospondina (THBS1), entre otras (**Tabla 8**). En presencia de Zn^{2+} y Ca^{2+} , la S100A8 y la S100A9 se asocian en un heterodímero conocido como calprotectina, un marcador de obesidad (Mortensen et al, 2009). El complejo S100A8/A9 se expresa a altos niveles en células mieloides como monocitos o neutrófilos (Zwadlo et al, 1988) y se considera un importante mediador de la inflamación crónica (Roth et al, 2003). De hecho, su expresión se ha correlacionado directamente con el contenido de macrófagos en tejido adiposo (Catalan et al, 2011), por lo que no es de extrañar que una mayor inflamación en pacientes diabéticas aparezca representada por proteínas como estas.

Por otro lado, las categorías disminuidas en pacientes diabéticas estaban relacionadas con la estructura y función mitocondrial, destacando la *generación de metabolitos precursores y energía*, la *síntesis de ATP* o el *metabolismo del piruvato* (**Tabla S8**). Estas categorías incluían DAPs como la citrato sintasa (CS), la subunidad α de la isocitrato deshidrogenasa (IDH3A) o diversas subunidades de la ATP sintasa (**Tabla 8**). El aumento de la proteína S100A9 y la disminución de CS en obesas diabéticas respecto a no diabéticas se validó en un conjunto adicional de muestras (**Figura 20**), confirmando otros estudios (Kelley et al, 2002; Ortega et al, 2013).

Tabla 8 | Análisis de enriquecimiento funcional de las DAPs que se encontraron exclusivamente en la comparación de DM2. Se muestran algunas categorías representativas con sus proteínas correspondientes, indicándose el código de acceso de UniProt así como el nombre de la proteína y su símbolo. El valor Zq asociado a cada una de las DAPs aparece en una escala de color amarillo-morado indicando mayor o menor abundancia en DM2, respectivamente. Las categorías funcionales se obtuvieron con el *software* DAVID (Huang da et al, 2009b). Las **Tablas S7 y S8** contienen el listado completo de categorías enriquecidas. Tabla modificada de (Gomez-Serrano et al, 2016).

Categoría	p valor	UniProt	Nombre de la proteína	Símbolo	Zq
Calcium ion binding (GO:0005509)	0,00	P06702	Protein S100-A9	S100A9	3,61
		P07996	Thrombospondin-1	THBS1	3,25
		P05109	Protein S100-A8	S100A8	3,05
		P55083	Microfibril-associated glycoprotein 4	MFAP4	2,81
		P13796	Plastin-2	LCP1	2,06
		P06703	Protein S100-A6	S100A6	2,02
Mitochondrion (GO:0005739)	0,00	P99999	Cytochrome c	CYCS	-2,01
		O75964	ATP synthase subunit g, mitochondrial	ATP5L	-2,02
		P50213	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial	IDH3A	-2,04
		O75947	ATP synthase subunit d, mitochondrial	ATP5H	-2,11
		Q5VTU8	ATP synthase subunit epsilon-like protein, mitochondrial	ATP5EP2	-2,12
		O75390	Citrate synthase, mitochondrial	CS	-2,27
		Q02252	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [acylating], mitochondrial	ALDH6A1	-2,27
		P05091	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	ALDH2	-2,29
		Q5VT66	Mitochondrial amidoxime-reducing component 1	MARC1	-2,43
		P38117	Electron transfer flavoprotein subunit beta	ETFB	-2,44

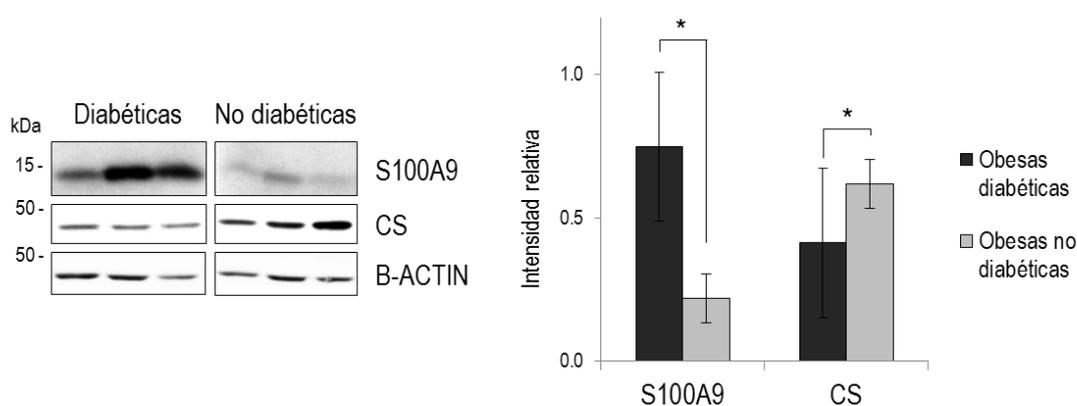


Figura 20 | Validación de DAPs mediante WB en el estudio diferencial de DM2 del VAT. Imágenes representativas de marcadores seleccionados que fueron analizados mediante WB en un conjunto independiente de muestras de VAT procedente de pacientes diabéticos (n=8) y pacientes no diabéticos (n=8). Los resultados se normalizaron con los datos obtenidos para la β -Actina. Los gráficos de barras muestran los valores de intensidad relativa como medias \pm DE obtenidos después de la densitometría de las bandas. La significación estadística se estableció en $p < 0,05$. **kDa**, peso molecular de las distintas bandas; *, $p < 0,05$. Figura adaptada de (Gomez-Serrano et al, 2016).

Las alteraciones en la señalización del calcio se han relacionado con el desarrollo de IR implicando defectos a nivel de mitocondria y RE (Fu et al, 2011; Tubbs et al, 2014). Por su parte, la CS se considera un marcador de integridad y funcionalidad mitocondrial (Burkart et al, 2016). Así pues, la disminución de marcadores como CS o S100A8/A9 en el VAT de pacientes diabéticas estaría estrechamente relacionada con defectos a nivel de mitocondria y RE.

1.1.4. Proteínas alteradas en el estudio de género

El análisis de las categorías funcionales englobadas por el conjunto de DAPs en hombres y mujeres resaltó que la remodelación del tejido adiposo y su respuesta antioxidante formaban parte del dimorfismo sexual en obesidad. En contraposición a los hombres, las mujeres presentaron una sobre-representación de proteínas involucradas en la *matriz extracelular* y la *respuesta inmune* (**Tabla S9**). Por su parte, los hombres presentaron un incremento de proteínas relacionadas con la *oxido-reducción* y la *actividad glutatión-transferasa* (**Tabla S10**), que incluían proteínas glutatión S-transferasas (GST) y superóxido dismutasas (SOD). Notablemente, ambos géneros mostraron un conjunto propio de proteínas oxido-reductasas aumentado, lo que sugería un fenotipo distintivo para cada sexo en relación a la respuesta antioxidante. Así, mientras que SOD1 y SOD3 eran más abundantes en los hombres, otras proteínas como las glutatión peroxidasas (GPX) 1 y 3 estaban incrementadas en mujeres (**Tabla 9**). Estudios previos indicaron que las ratas hembras tienen una respuesta antioxidante más efectiva en comparación con los machos debido a un aumento exclusivo de la actividad GPX (Guevara et al, 2011), apoyando nuestros resultados. Para validar estos datos, se analizó la expresión diferencial de algunas oxido-reductasas en el VAT de mujeres y hombres mediante WB (**Figura 21**). De esta manera, nuestro estudio mostró por primera vez un patrón de proteínas antioxidantes específico de género en pacientes con DM2 (Gomez-Serrano et al, 2016).

Las SOD se encuentran en la primera línea de defensa contra ROS, actuando específicamente sobre los radicales de anión superóxido (Oberley, 2005). SOD1 es la proteína más estudiada y se localiza principalmente en el citoplasma; SOD3, sin embargo, está asociada al componente extracelular (Zelko et al, 2002). Las GPX constituyen una familia de selenoproteínas encargadas de catalizar la degradación del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) utilizando el glutatión (GSH) como agente reductor (Ursini et al, 1995). GPX1 se encuentra fundamentalmente en el citosol y la mitocondria, mientras que GPX3 lo hace en el plasma sanguíneo (Brigelius-Flohe & Maiorino, 2013). Estas diferencias entre isoformas nos llevan a proponer que, de acuerdo a nuestros datos proteómicos, tanto hombres como mujeres tienen una respuesta antioxidante distinta en cada compartimento celular.

Recientemente se ha señalado la importancia de la regulación redox sobre distintos factores transcripcionales que controlan el proceso de adipogénesis (Wang & Hai, 2015). De acuerdo a estas hipótesis, nuestros datos nos hicieron sopesar si esta regulación podría ser diferente entre hombres y mujeres, afectando directamente a proteínas implicadas en la remodelación del tejido adiposo. Una de las posibles candidatas que encontramos fue la sintasa de ácidos grasos (FASN) (**Tabla 9**), implicada en la

síntesis *de novo* de los ácidos grasos (Semenkovich, 1997). El incremento de esta enzima en mujeres respecto a hombres diabéticos fue confirmado mediante WB (**Figura 21**), lo cual evidencia diferencias moleculares en la plasticidad del VAT incluso después de que haya aparecido la DM2.

Tabla 9 | Análisis de enriquecimiento funcional de las DAPs que se encontraron exclusivamente en la comparación de género. Se muestran algunas categorías representativas con sus proteínas correspondientes, indicándose el código de acceso de UniProt así como el nombre de la proteína y su símbolo. El valor Zq asociado a cada una de las DAPs aparece en una escala de color amarillo-morado indicando mayor abundancia en mujeres u hombres, respectivamente. Las categorías funcionales se obtuvieron con el *software* DAVID (Huang da et al, 2009b). Las **Tablas S9** y **S10** contienen el listado completo de categorías enriquecidas. Tabla modificada de (Gomez-Serrano et al, 2016).

Categoría	p valor	UniProt	Nombre de la proteína	Símbolo	Zq
<i>Inflammatory response</i> (GO:0006954)	0,00	P02763	Alpha-1-acid glycoprotein 1	ORM1	5,44
		P04003	C4b-binding protein alpha chain	C4BPA	3,67
		P05155	Plasma protease C1 inhibitor	SERPING1	3,15
		P10909	Clusterin	CLU	2,73
		P02751	Fibronectin	FN1	2,42
<i>Oxidation reduction</i> (GO:0055114)	0,01	P49327	Fatty acid synthase	FASN	5,59
		Q53TN4	Cytochrome b reductase 1	CYBRD1	4,35
		P00450	Ceruloplasmin	CP	4,21
		P07203	Glutathione peroxidase 1	GPX1	2,94
		O75891	Cytosolic 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase	ALDH1L1	2,69
		P22352	Glutathione peroxidase 3	GPX3	2,03
<i>Oxidation reduction</i> (GO:0055114)	0,00	P40939	Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial	HADHA	-2,03
		Q13162	Peroxiredoxin-4	PRDX4	-2,73
		P00441	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	SOD1	-2,81
		P00352	Retinal dehydrogenase 1	ALDH1A1	-3,08
		P07195	L-lactate dehydrogenase B chain	LDHB	-3,09
		P21397	Amine oxidase [flavin-containing] A	MAOA	-3,16
		P08294	Extracellular superoxide dismutase [Cu-Zn]	SOD3	-3,74
		Q92781	11-cis retinol dehydrogenase	RDH5	-6,65
<i>Glutathione transferase activity</i> (GO:0004364)	0,00	P09211	Glutathione S-transferase P	GSTP1	-2,35
		P28161	Glutathione S-transferase Mu 2	GSTM2	-2,55
		P30711	Glutathione S-transferase theta-1	GSTT1	-3,49
		P09488	Glutathione S-transferase Mu 1	GSTM1	-5,63

La maquinaria antioxidante predominante en cada género difiere en su ROS diana y en su regulación (tal como se describió anteriormente para las SOD y las GPX). Además, la actividad enzimática de proteínas como FASN puede regularse mediante modificaciones oxidativas (Choi et al, 2016). Por ello, creemos que el estudio exhaustivo de la regulación redox en el tejido adiposo de hombres y mujeres ayudará al diseño de dianas terapéuticas para la DM2 mejor adaptadas a cada sexo.

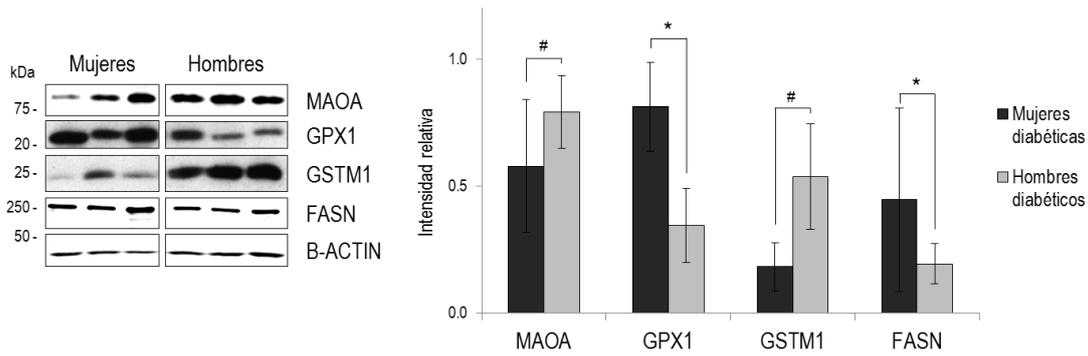


Figura 21 | Validación de DAPs mediante WB en el estudio diferencial de género del VAT. Imágenes representativas de marcadores seleccionados que fueron analizados mediante WB en un conjunto independiente de muestras de VAT procedente de obesas diabéticas (n=8) y obesos diabéticos (n=8). Los resultados se normalizaron con los datos obtenidos para la β -Actina. Los gráficos de barras muestran los valores de intensidad relativa como medias \pm DE obtenidos después de la densitometría de las bandas. La significación estadística se estableció en $p < 0,05$. **kDa**, peso molecular de las distintas bandas; *, $p < 0,05$; #, $p < 0,01$. Figura adaptada de (Gomez-Serrano et al, 2016).

1.2. Búsqueda de cambios proteicos coordinados mediante la aplicación de herramientas de Biología de Sistemas

La mayoría de los estudios proteómicos descritos hasta la fecha se han centrado en el estudio de proteínas individuales, lo que tiene dos inconvenientes fundamentales: i) los resultados dependen arbitrariamente del umbral establecido por el investigador para determinar aquellos cambios estadísticamente significativos; y ii) gran parte de la información cuantitativa queda enmascarada. Para paliar estos defectos, en la presente Tesis Doctoral se aplicó el modelo estadístico SBT (García-Marques et al, 2016), el cual es especialmente adecuado para realizar análisis de conjuntos de datos proteómicos completos. Según el modelo SBT, un conjunto de proteínas pertenecientes a una categoría funcional se considera “regulado coordinadamente” cuando los cambios sufridos por sus componentes (las proteínas) no siguen una distribución normal y se muestran significativamente incrementados o disminuidos, bajo una FDR determinada. En el presente trabajo de Tesis Doctoral, se consideraron reguladas significativamente aquellas categorías con al menos 5 proteínas y una FDR $< 0,05$. Debido al diseño jerárquico de las anotaciones en las categorías funcionales, por ejemplo, las categorías GO parentales e hijas (Ashburner et al, 2000), los cambios coordinados que se detectan suelen estar compuestos por las mismas proteínas. Por esta razón, se necesita realizar paralelamente un análisis de agrupamiento o *clustering* de esas categorías funcionales basado en la frecuencia de proteínas compartidas. Una vez realizado ese agrupamiento, el grado de coordinación se puede ilustrar mediante una curva sigmoidea en la que se representa la frecuencia acumulada de los cambios Z_q para cada una de las proteínas que integra una categoría. En nuestro estudio, se eligieron las categorías funcionales menos redundantes como las más representativas de cada *cluster*. El desplazamiento de la curva respecto a la distribución

sigmoidea de la teórica normal (correspondiente a una gaussiana) muestra la regulación positiva o negativa en una condición respecto a la otra (en nuestro caso, en un grupo de pacientes respecto a otro), sin que necesariamente todos los componentes de esa respuesta sean DAPs. De esta manera, la aplicación combinada de los modelos WSPP y SBT en nuestro estudio nos han permitido evaluar los cambios drásticos del proteoma (representados por las DAPs) junto con los cambios dinámicos (representados por los cambios proteicos coordinados).

1.2.1. Cambios dinámicos del VAT con el envejecimiento

En el estudio diferencial de edad, se encontraron 62 categorías funcionales alteradas que se agrupaban en un total de 8 *clusters* (Figura 22, Tabla 10).

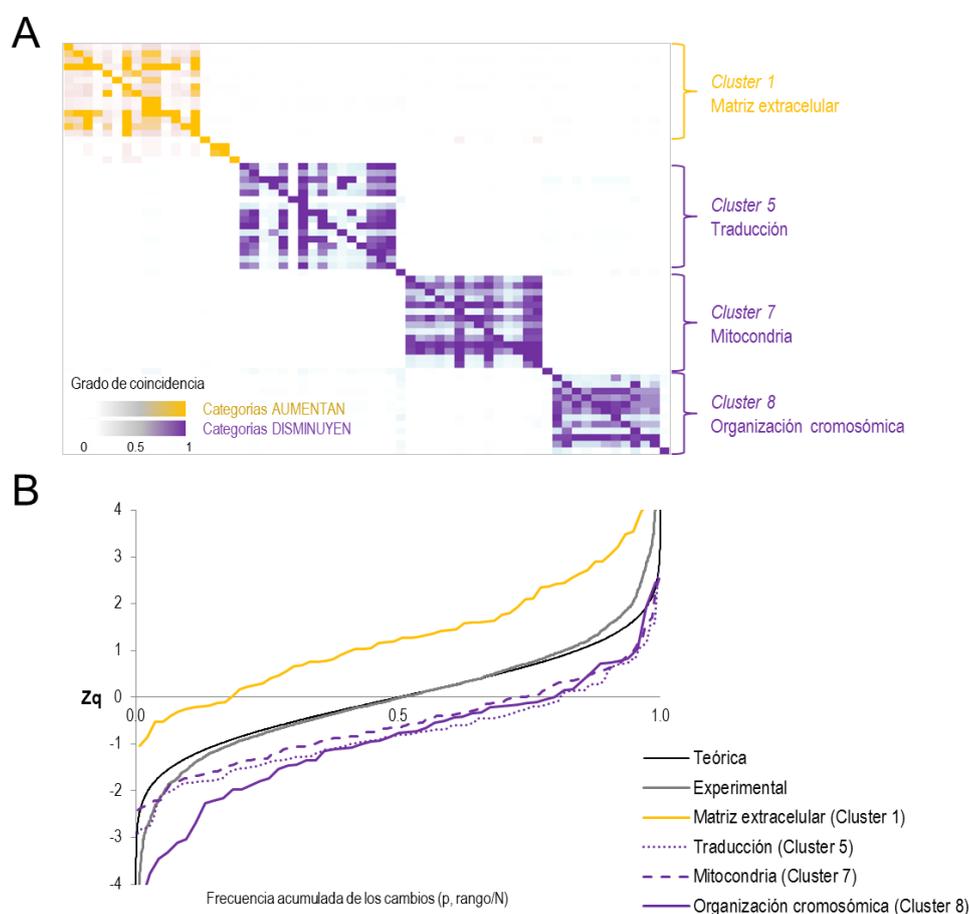


Figura 22 | Cambios proteicos coordinados en el VAT de pacientes obesos con la edad. (A) Agrupamiento de las categorías funcionales alteradas en función del grado de coincidencia de proteínas. Filas y columnas siguen el mismo orden al mostrado en la **Tabla 10**. La escala de color amarillo-morado se utilizó para representar aquellas categorías que aumentan y disminuyen con la edad, respectivamente. **(B)** Representación del grado de coordinación de los cambios proteicos. El gráfico muestra la frecuencia acumulada de los cambios (valor Zq) para para las categorías y *clusters* más representativos (ver **Tabla S11**). Se muestra también la distribución de una curva teórica normal (en negro) así como la distribución de los datos experimentales (línea gris) obtenidos para todo el conjunto de proteínas cuantificadas en el estudio diferencial de edad (n=2 371). El desplazamiento respecto a la curva teórica

hacia arriba o hacia abajo indica un aumento o disminución global de las proteínas que pertenecen a la categoría/*cluster* funcional en mujeres obesas mayores de 45 años vs. menores de 35 años, respectivamente. Figura modificada de (Gomez-Serrano et al, 2016).

La Biología de Sistemas reveló que uno de los conjuntos más grandes incluía categorías relacionadas con proteínas de la ECM (*Cluster 1*), en el que la mayoría de los componentes estaban incrementados en obesas mayores respecto a obesas más jóvenes. Este resultado concuerda con el hecho de que el tejido adiposo es un órgano plástico sometido a una amplia remodelación mediante la regulación de componentes de la ECM (Sun et al, 2011). Varios trabajos han indicado que el depósito inadecuado de la ECM así como su mayor rigidez dificultan la expansión del tejido adiposo, especialmente en procesos como el envejecimiento y la obesidad (Pessin & Kwon, 2012; Sun et al, 2013). Nuestros resultados están en línea con estas observaciones y además realzan que la acumulación de proteínas de la ECM en el VAT con el paso del tiempo no solo ocurre con ciertas proteínas individuales (como se describió anteriormente para las DAPs; **Tabla 7, Tabla S5**), sino que existe un aumento global de todas ellas.

La *síntesis de hormonas esteroideas* y la *vía de señalización PPAR* fueron otras de las categorías significativamente incrementadas en mujeres mayores (**Tabla 10, Tabla S11**). Publicaciones previas han señalado que el tejido adiposo podría convertirse en una fuente extra-gonadal de esteroides con el paso del tiempo (Simpson, 2003), lo que explicaría el aumento de enzimas relacionadas con el metabolismo de estas moléculas en las pacientes de mayor edad. Además, se ha sugerido que el metabolismo de esteroides puede tener efectos importantes en la adiposidad (Belanger et al, 2002). Es importante recordar que PPAR γ es uno de los mediadores clave de la adipogénesis (Tang & Lane, 2012), por lo que encontrar la *vía de señalización PPAR* significativamente alterada junto con la *síntesis de hormonas esteroideas* nos llevó a plantearnos si nuestros datos podrían estar reflejando modificaciones morfológicas en el tejido adiposo de individuos obesos con el envejecimiento. Por ello, evaluamos el tamaño del diámetro de los adipocitos en biopsias de VAT procedente de pacientes no diabéticos de mayor (n=3, media 51 años) y menor edad (n=3, media 31 años) (**Figura 23A**). Los resultados mostraron que los adipocitos de las obesas mayores tenían un área total y diámetro significativamente mayor respecto a los de las pacientes más jóvenes (**Figura 23B**); sin embargo, no existían diferencias significativas entre las poblaciones de adipocitos de distinto tamaño (**Figura 23C**). Estos datos nos llevan a concluir que el aumento de las proteínas relacionadas con las hormonas esteroideas y la vía de señalización PPAR se asocian con una mayor hipertrofia de los adipocitos con el envejecimiento.

Otros *clusters* importantes incluían proteínas disminuidas relacionadas con la *traducción* (*Cluster 5*), la *mitocondria* (*Cluster 7*) y la *organización cromosómica* (*Cluster 8*) (**Tabla 10**). Estos resultados eran similares a los encontrados en los análisis de enriquecimiento de DAPs descritos anteriormente (**Tabla 7, Tabla S6**), lo que recalca que los cambios dinámicos detectados en las alteraciones coordinadas también se acompañan a veces de cambios drásticos en proteínas singulares.

Tabla 10 | Cambios proteicos coordinados en el VAT en función de la edad. Categorías funcionales diferencialmente moduladas con $FDR < 0,05$ y $n \geq 5$. **Zc** es el ratio logarítmico estandarizado para cada categoría y **FDRc** su tasa de error asociada. Se ha añadido una escala de color amarillo-morado para representar el incremento o disminución de la respuesta con la edad, respectivamente. **N** representa el número de proteínas que pertenecen a cada categoría. Para cada *cluster*, se eligieron como representativas las categorías menos redundantes. En gris se indican aquellas representadas en la **Figura 22B**. El listado completo de las proteínas se encuentra en la **Tabla S11**. Tabla modificada de (Gomez-Serrano et al, 2016).

Número <i>cluster</i>	Código categoría	Nombre categoría	Zc	FDRc	N
1	P00034	Integrin signalling pathway	3,30	0,03	69
	hsa04512	ECM-receptor interaction	4,63	0,00	30
	GO:0044420	extracellular matrix part	5,83	0,00	32
	GO:0043256	laminin complex	4,19	0,00	5
	GO:0043062	extracellular structure organization	3,91	0,01	33
	GO:0034329	cell junction assembly	3,10	0,05	12
	GO:0031012	extracellular matrix	6,91	0,00	68
	GO:0030198	extracellular matrix organization	3,90	0,01	28
	GO:0022610	biological adhesion	3,74	0,01	116
	GO:0007155	cell adhesion	3,71	0,01	115
	GO:0005605	basal lamina	4,17	0,00	6
	GO:0005604	basement membrane	5,12	0,00	21
	GO:0005581	collagen	4,59	0,00	14
GO:0005578	proteinaceous extracellular matrix	7,20	0,00	61	
2	hsa03320	PPAR signaling pathway	3,48	0,02	24
3	GO:0045104	intermediate filament cytoskeleton organization	3,28	0,03	7
	GO:0045103	intermediate filament-based process	4,58	0,00	8
4	hsa00140	Steroid hormone biosynthesis	4,46	0,00	5
5	hsa03010	Ribosome	-6,16	0,00	74
	GO:0044445	cytosolic part	-4,33	0,00	93
	GO:0042274	ribosomal small subunit biogenesis	-3,90	0,01	9
	GO:0042254	ribosome biogenesis	-3,58	0,01	25
	GO:0033279	ribosomal subunit	-6,15	0,00	73
	GO:0030530	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complex	-3,27	0,03	11
	GO:0030529	ribonucleoprotein complex	-4,93	0,00	155
	GO:0022627	cytosolic small ribosomal subunit	-4,38	0,00	35
	GO:0022626	cytosolic ribosome	-5,80	0,00	69
	GO:0022625	cytosolic large ribosomal subunit	-5,38	0,00	32
	GO:0022613	ribonucleoprotein complex biogenesis	-3,43	0,02	33
	GO:0015935	small ribosomal subunit	-4,55	0,00	36
	GO:0015934	large ribosomal subunit	-5,96	0,00	38
	GO:0006414	translational elongation	-5,92	0,00	81
	GO:0006412	translation	-4,85	0,00	136
GO:0005840	ribosome	-6,11	0,00	90	
6	GO:0006350	transcription	-3,22	0,04	93

7	hsa00190	Oxidative phosphorylation	-3,21	0,04	64
	GO:0070469	respiratory chain	-3,77	0,01	40
	GO:0045333	cellular respiration	-3,27	0,03	57
	GO:0044455	mitochondrial membrane part	-3,10	0,05	61
	GO:0042773	ATP synthesis coupled electron transport	-3,55	0,02	32
	GO:0031966	mitochondrial membrane	-3,10	0,05	153
	GO:0022904	respiratory electron transport chain	-3,45	0,02	37
	GO:0022900	electron transport chain	-3,44	0,02	58
	GO:0019866	organelle inner membrane	-3,48	0,02	137
	GO:0006119	oxidative phosphorylation	-3,15	0,04	47
	GO:0005747	mitochondrial respiratory chain complex I	-3,13	0,05	24
	GO:0005746	mitochondrial respiratory chain	-3,57	0,01	34
	GO:0005743	mitochondrial inner membrane	-3,47	0,02	130
	GO:0005740	mitochondrial envelope	-3,28	0,03	158
8	GO:0051101	regulation of DNA binding	-3,24	0,03	20
	GO:0051276	chromosome organization	-5,12	0,00	57
	GO:0044427	chromosomal part	-4,83	0,00	49
	GO:0034728	nucleosome organization	-7,55	0,00	22
	GO:0032993	protein-DNA complex	-7,34	0,00	21
	GO:0006334	nucleosome assembly	-7,94	0,00	21
	GO:0006333	chromatin assembly or disassembly	-7,62	0,00	24
	GO:0006325	chromatin organization	-5,56	0,00	44
	GO:0006323	DNA packaging	-7,44	0,00	25
	GO:0005694	chromosome	-5,36	0,00	58
	GO:0000786	nucleosome	-8,12	0,00	16
	GO:0000785	chromatin	-7,50	0,00	30
	GO:0006310	DNA recombination	-3,38	0,02	15

Los análisis de Biología de Sistemas pusieron de manifiesto la disminución de proteínas relacionadas con la síntesis proteica, el remodelado cromosómico, el procesamiento del mRNA, y la unión a ribosomas y nucleosomas en obesas no diabéticas de mayor edad (**Tabla 10**). Los cambios en la arquitectura cromosómica, tales como la pérdida global de heterocromatina y su redistribución se consideran características típicas del proceso de envejecimiento (Larson et al, 2012; Pegoraro et al, 2009), lo que apoya nuestros resultados. Asimismo, un análisis de transcriptómica realizado en leucocitos de sangre periférica demostró la disminución de proteínas implicadas en la transcripción y traducción génicas con la edad (Harries et al, 2011). Cabe destacar que nuestro estudio, basado en un análisis proteómico de tejido adiposo humano, haya encontrado los mismos procesos disminuidos en relación al envejecimiento.

Por otro lado, la disminución de proteínas relacionadas con el transporte y la organización de la membrana mitocondrial en mujeres de mayor edad también se indicaron en los análisis de DAPs (**Tabla 7, Tabla S6**). Estos datos subrayan la importancia del envejecimiento en la disfunción mitocondrial del VAT ya que las alteraciones del tráfico molecular impactan directamente en la comunicación intra- e inter-

órgano, y por lo tanto, en la comunicación endocrina intra- e inter-celular (Nelson et al, 2012; Russell & Kahn, 2007).

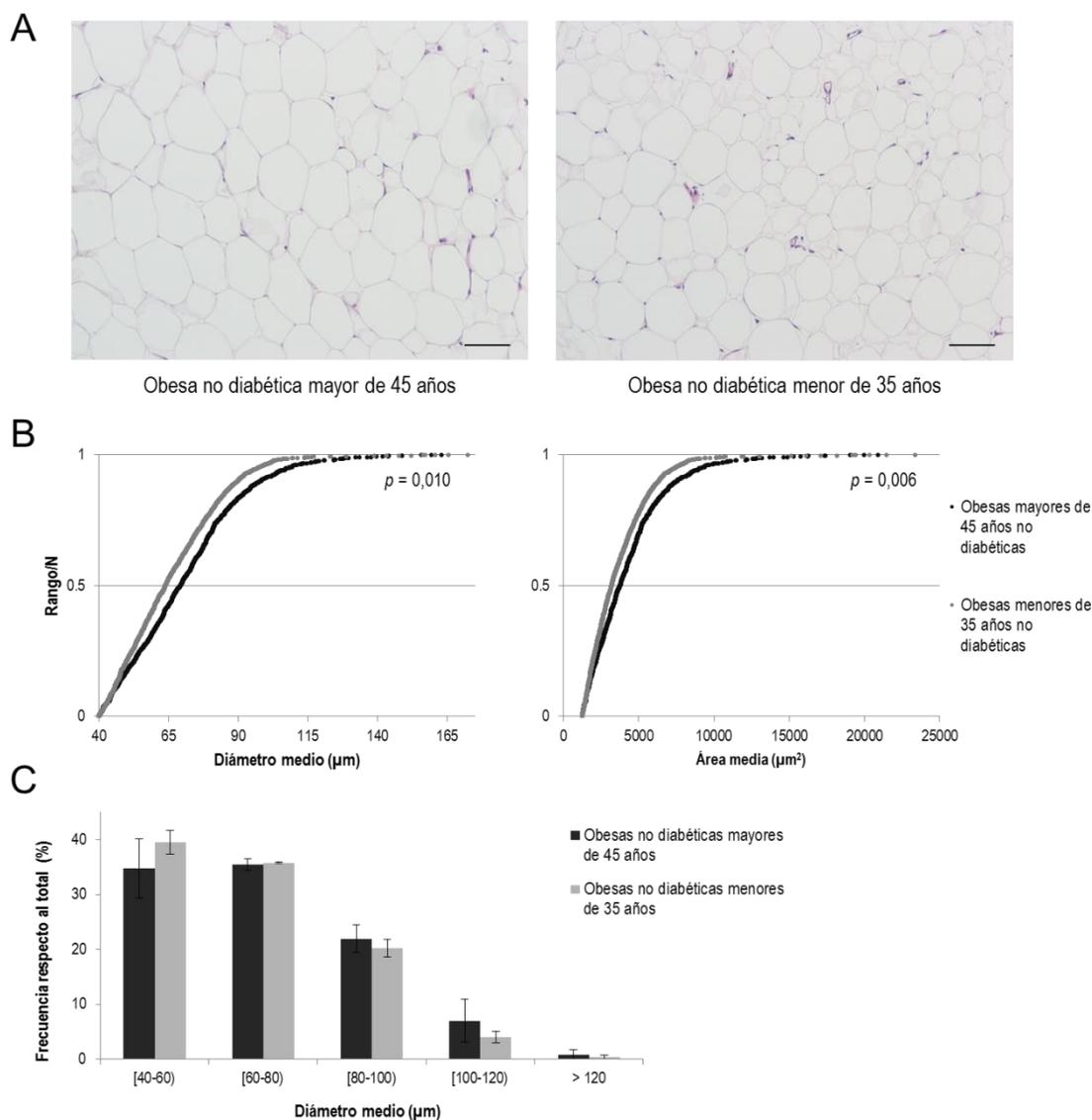


Figura 23 | Evaluación de la celularidad del VAT en función de la edad. Las secciones de VAT teñidas con hematoxilina-eosina se analizaron en pacientes obesas no diabéticas mayores de 45 años ($n=3$, media 51 años) y menores de 35 años ($n=3$, media 31 años) mediante el *software* Adiposoft (Galarraga et al, 2012). La medida automatizada del tamaño de adipocitos se acotó entre los 40 y 175 μm de diámetro. **(A)** Imágenes representativas a un aumento de 100X. Escala, 100 μm . **(B)** Distribución de los datos para el diámetro medio (μm) y el área media (μm^2) de un experimento representativo en obesas mayores de 45 años (serie negra, $n=1\ 044$) y menores de 35 años (serie gris, $n=1\ 508$). **(C)** Frecuencias de adipocitos (%) en función a distintos rangos de diámetro. Las barras representan la media del porcentaje relativo para cada rango \pm DE en obesas mayores de 45 años (barras negras) y menores de 35 años (barras grises) obtenidas a partir de dos experimentos independientes. La significación estadística se estableció en $p < 0,05$.

Además, el análisis de cambios proteicos coordinados reveló que el remodelamiento mitocondrial se acompañaba también de una disminución general de proteínas relacionadas con el metabolismo energético, señalando la alteración particular de la ETC y sus complejos mitocondriales (**Tabla 10, Tabla S11**). Así pues, nuestro estudio enfatizó que la eficacia de la cadena respiratoria tiende a disminuir en el VAT con el paso del tiempo, lo que incrementaría la pérdida de electrones y disminuiría la generación de ATP (Green et al, 2011).

1.2.2. Cambios dinámicos del VAT en función de la DM2

Los análisis de Biología de Sistemas en el estudio diferencial de DM2 desvelaron que 64 categorías funcionales estaban significativamente reguladas (**Figura 24, Tabla 11**).

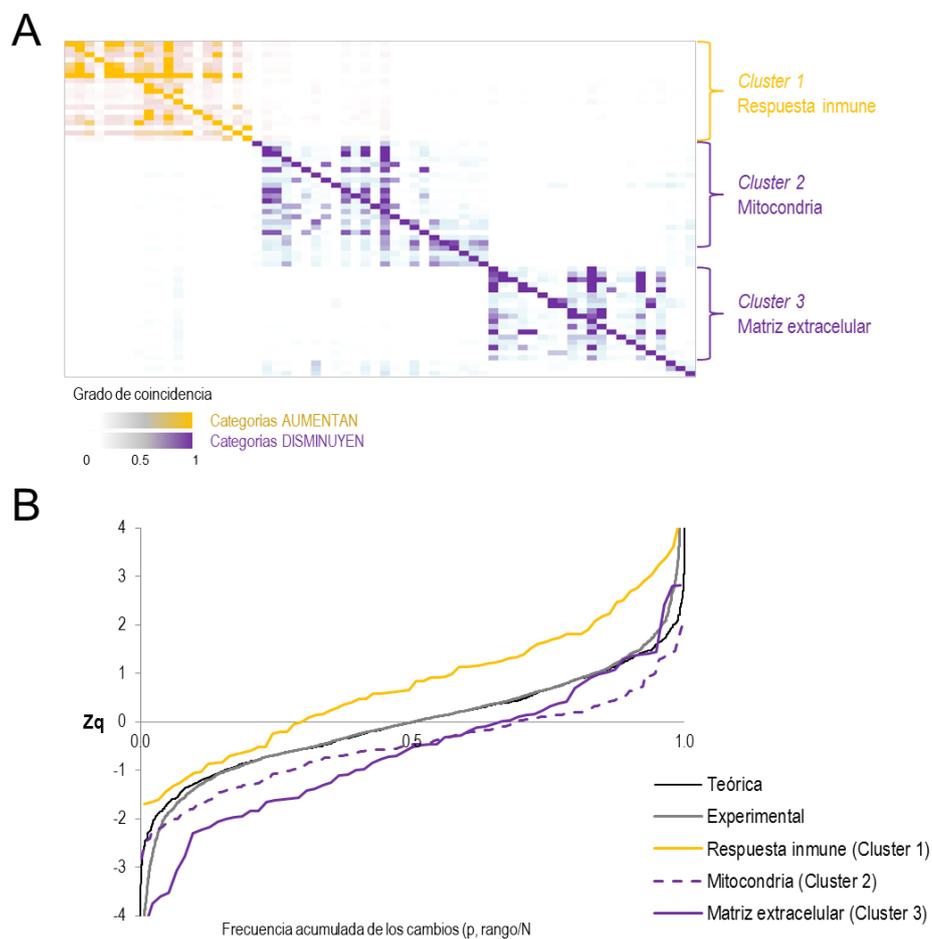


Figura 24 | Cambios proteicos coordinados en el VAT de pacientes obesos en relación a la DM2. (A) Agrupamiento de las categorías funcionales alteradas en función del grado de coincidencia de proteínas. Filas y columnas siguen el mismo orden al mostrado en la **Tabla 11**. La escala de color amarillo-morado se utilizó para representar aquellas categorías que aumentan y disminuyen con la DM2, respectivamente. **(B)** Representación del grado de coordinación de los cambios proteicos. El gráfico muestra la frecuencia acumulada de los cambios (valor Zq) para las categorías y *clusters* más representativos (ver **Tabla S12**). Se muestra también la distribución de una curva teórica normal (en negro) así como la distribución de los datos experimentales (línea gris) obtenidos para todo

el conjunto de proteínas cuantificadas en el estudio diferencial de DM2 (n=2 371). El desplazamiento respecto a la curva teórica hacia arriba o hacia abajo indica un aumento o disminución global de las proteínas que pertenecen a la categoría/*cluster* funcional en mujeres obesas diabéticas vs. no diabéticas, respectivamente. Figura modificada de (Gomez-Serrano et al, 2016).

El conjunto de proteínas relacionadas con la *respuesta inmune* (*Cluster 1*) se encontraba aumentado en mujeres diabéticas respecto a no diabéticas junto con otros dos grandes grupos de categorías relacionadas con la *mitocondria* (*Cluster 2*) y la *matriz extracelular* (*Cluster 3*), que estaban disminuidos (**Figura 24A**). Cabe destacar que el conjunto de proteínas mitocondriales (*Cluster 2*) comprendía no solo categorías relacionadas con el metabolismo energético como la *oxidación fosforilativa*, sino también otras funciones metabólicas mitocondriales como el *ciclo de los ácidos tricarbónicos* o la *degradación de valina, leucina e isoleucina* (**Tabla 11**), en consonancia con los resultados de análisis de enriquecimiento de DAPs (**Tabla 8, Tabla S8**). El ciclo de Krebs o ciclo del TCA es una de las rutas metabólicas clave ya que conecta el metabolismo de los carbohidratos con el de los ácidos grasos y aminoácidos (Akram, 2014). Todos sus integrantes se encuentran en la matriz mitocondrial, lo que subraya el papel central de la mitocondria en la homeostasis del organismo. La valina, leucina e isoleucina son aminoácidos de cadena ramificada, conocidos también como BCAAs, y parte de su catabolismo tiene lugar en la mitocondria (Brosnan & Brosnan, 2006). Nuestros resultados están en línea con otras investigaciones en las que se ha documentado la alteración del metabolismo de BCAAs en el tejido adiposo con la obesidad (Pietilainen et al, 2008) así como con defectos en la señalización de insulina, especialmente en pacientes con DM2 (revisado en (Adeva et al, 2012)).

Es importante recordar que la obesidad se considera una enfermedad inflamatoria crónica de bajo grado (Dandona et al, 2004) y diversos estudios han sugerido que la inflamación del tejido adiposo contribuye al aumento de marcadores pro-inflamatorios en la circulación (Fontana et al, 2007; Maachi et al, 2004) propiciando el desarrollo de comorbilidades como la DM2 (Donath & Shoelson, 2011). Nuestros resultados mostraron un incremento global de proteínas relacionadas con la respuesta inmune en el VAT de pacientes diabéticas respecto a no diabéticas (*Cluster 1*) (**Figura 24, Tabla 11**), en consonancia a estas observaciones. Es probable que estos cambios en el proteoma reflejen una mayor respuesta inflamatoria en el tejido adiposo, lo que podría estar ligado a una mayor infiltración de macrófagos (Lasselin et al, 2014; Weisberg et al, 2003). Por otro lado, la inflamación crónica del tejido adiposo se ha relacionado a su vez con el aumento de la adiposidad (Park et al, 2005). Nuestros datos pusieron de manifiesto que además de un aumento de la *respuesta inmune* (*Cluster 1*), los pacientes diabéticos presentaron también una disminución de la *vía de señalización PPAR* (*Cluster 4*) y de la *homeostasis lipídica* (*Cluster 5*) (**Tabla 11**). Como se ha descrito en apartados anteriores, estas funciones representan procesos esenciales del tejido adiposo con especial relevancia en el contexto de obesidad, lo que nos llevó a plantearnos si el patrón de cambios proteicos coordinados en DM2 se relacionaba a su vez con alteraciones en la plasticidad del tejido adiposo. Para comprobar estos defectos, se evaluó la celularidad de secciones histológicas de VAT en pacientes diabéticos y no diabéticos (**Figura 25**).

Tabla 11 | Cambios proteicos coordinados del VAT en relación a la DM2. Categorías funcionales diferencialmente moduladas con $FDR < 0,05$ y $n \geq 5$. **Zc** es el ratio logarítmico estandarizado para cada categoría y **FDRc** su tasa de error asociada. Se ha añadido una escala de color amarillo-morado para representar el incremento o disminución de la respuesta en pacientes diabéticos, respectivamente. **N** representa el número de proteínas que pertenecen a cada categoría. Para cada *cluster*, se eligieron como representativas las categorías menos redundantes. En gris se indican aquellas representadas en la **Figura 24B**. El listado completo de las proteínas se encuentra en la **Tabla S12**. Tabla modificada de (Gomez-Serrano et al, 2016).

Número <i>cluster</i>	Código categoría	Nombre categoría	Zc	FDRc	N
1	GO:0002250	adaptive immune response	3,21	0,04	10
	GO:0002252	immune effector process	4,41	0,00	21
	GO:0002253	activation of immune response	3,17	0,04	12
	GO:0002263	cell activation during immune response	3,57	0,01	7
	GO:0002443	leukocyte mediated immunity	3,84	0,01	15
	GO:0002449	lymphocyte mediated immunity	3,76	0,01	13
	GO:0002455	humoral immune response mediated by circulating immunoglobulin	3,73	0,01	5
	GO:0002684	positive regulation of immune system process	3,93	0,01	25
	GO:0006952	defense response	4,32	0,00	76
	GO:0006954	inflammatory response	3,25	0,03	43
	GO:0006955	immune response	3,85	0,01	82
	GO:0009611	response to wounding	3,31	0,03	84
	GO:0016485	protein processing	4,21	0,00	15
	GO:0042742	defense response to bacterium	3,74	0,01	8
	GO:0045087	innate immune response	4,95	0,00	18
	GO:0050778	positive regulation of immune response	3,45	0,02	16
	GO:0009581	detection of external stimulus	3,45	0,02	6
	GO:0051605	protein maturation by peptide bond cleavage	4,86	0,00	10
GO:0051606	detection of stimulus	4,41	0,00	9	
2	-	Energy production and conversion	-4,11	0,00	15
	GO:0005740	mitochondrial envelope	-3,59	0,01	158
	GO:0005743	mitochondrial inner membrane	-3,58	0,01	130
	GO:0005759	mitochondrial matrix	-4,04	0,00	86
	GO:0006084	acetyl-CoA metabolic process	-4,00	0,00	21
	GO:0006119	oxidative phosphorylation	-3,18	0,04	47
	GO:0006631	fatty acid metabolic process	-4,04	0,00	59
	GO:0009060	aerobic respiration	-3,31	0,03	24
	GO:0015908	fatty acid transport	-3,48	0,02	5
	GO:0019866	organelle inner membrane	-3,43	0,02	137
	GO:0022900	electron transport chain	-3,10	0,05	58
	GO:0031966	mitochondrial membrane	-3,59	0,01	153
	GO:0043648	dicarboxylic acid metabolic process	-3,15	0,04	16
	GO:0044429	mitochondrial part	-4,07	0,00	214
	hsa00020	Citrate cycle (TCA cycle)	-3,41	0,02	25

	hsa00062	Fatty acid elongation in mitochondria	-3,61	0,01	7
	hsa00071	Fatty acid metabolism	-4,91	0,00	31
	hsa00190	Oxidative phosphorylation	-3,80	0,01	64
	hsa00280	Valine, leucine and isoleucine degradation	-3,86	0,01	33
	hsa00310	Lysine degradation	-3,62	0,01	14
	hsa00380	Tryptophan metabolism	-3,18	0,04	18
	hsa00620	Pyruvate metabolism	-3,28	0,03	28
	hsa00640	Propanoate metabolism	-3,96	0,01	26
	hsa00650	Butanoate metabolism	-3,97	0,00	18
3	GO:0005578	proteinaceous extracellular matrix	-3,16	0,04	60
	GO:0005581	collagen	-3,15	0,04	14
	GO:0005583	fibrillar collagen	-5,69	0,00	6
	GO:0005604	basement membrane	-3,74	0,01	21
	GO:0005605	basal lamina	-3,91	0,01	6
	GO:0007179	transforming growth factor beta receptor signaling pathway	-3,14	0,04	5
	GO:0010810	regulation of cell-substrate adhesion	-4,34	0,00	7
	GO:0010811	positive regulation of cell-substrate adhesion	-3,34	0,03	6
	GO:0030198	extracellular matrix organization	-4,20	0,00	29
	GO:0030199	collagen fibril organization	-4,41	0,00	9
	GO:0031012	extracellular matrix	-3,78	0,01	67
	GO:0043062	extracellular structure organization	-3,81	0,01	34
	GO:0043256	laminin complex	-3,73	0,01	5
	GO:0043588	skin development	-3,71	0,01	5
	GO:0044236	multicellular organismal metabolic process	-3,67	0,01	9
GO:0044420	extracellular matrix part	-4,31	0,00	31	
GO:0045785	positive regulation of cell adhesion	-3,61	0,01	10	
hsa04512	ECM-receptor interaction	-3,13	0,04	29	
4	hsa03320	PPAR signaling pathway	-4,42	0,00	24
	hsa04920	Adipocytokine signaling pathway	-4,04	0,00	11
5	Lipid metabolism	Lipid metabolism	-4,27	0,00	27

Nuestros resultados no mostraron diferencias significativas en el área o el diámetro medio de los adipocitos (**Figura 25A**), ni tampoco entre las poblaciones de distinto tamaño (**Figura 25B**). Desde hace décadas, la hipertrofia de los adipocitos se ha relacionado con la pérdida de sensibilidad a insulina en pacientes tanto delgados como obesos (Hoffstedt et al, 2010; Salans et al, 1968; Skurk et al, 2007; Stern et al, 1972). Por ello, cabría esperar que los adipocitos de obesas no diabéticas hubieran sido más pequeños que los de las pacientes con DM2. Un trabajo del grupo de Karine Clément, demostró que el volumen de adipocitos se relaciona directamente con el riesgo de desarrollo de DM2 así como con el éxito de recuperación de estos pacientes tras someterse a cirugía bariátrica (Cotillard et al, 2014). Dado que las pacientes diabéticas y no diabéticas analizadas en este trabajo se encontraban en el rango de edad superior (mayor a 45 años), es probable que nuestras pacientes no diabéticas tuvieran ya un alto riesgo de desarrollo de DM2 (pese a no haber manifestado aún la enfermedad), lo que explicaría que no fuera posible encontrar diferencias en el tamaño de los adipocitos.

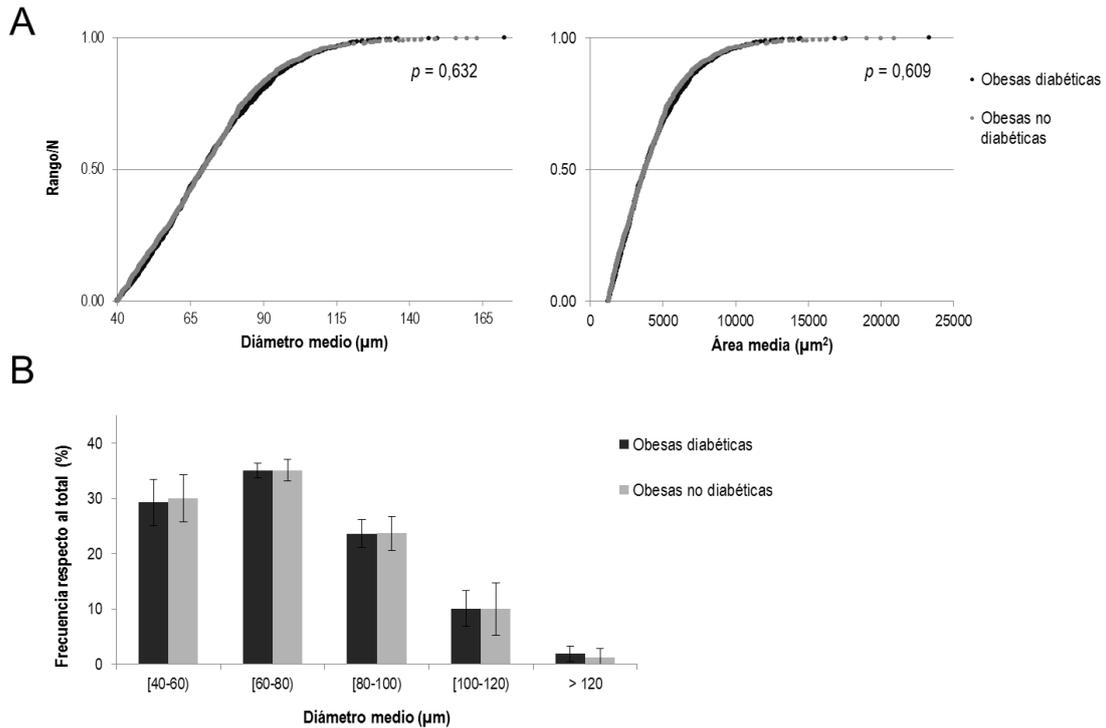


Figura 25 | Evaluación de la celularidad del VAT en relación a la DM2. Las secciones de VAT teñidas con hematoxilina-eosina se analizaron en pacientes obesos diabéticos (n=3, media 50 años) y no diabéticos (n=3, media 51 años) mediante el *software* Adiposoft (Galarraga et al, 2012). La medida automatizada del tamaño de adipocitos se acotó entre los 40 y 175 µm de diámetro. **(A)** Distribución de los datos para el diámetro medio (µm) y el área media (µm²) en obesos diabéticos (serie negra, n=1 181) y no diabéticos (serie gris, n=1 044) de un experimento representativo. **(B)** Frecuencias de adipocitos (%) en función a distintos rangos de diámetro. Las barras representan la media del porcentaje relativo para cada rango \pm DE en obesos diabéticos (barras negras) y no diabéticos (barras grises) obtenidas a partir de dos experimentos independientes. La significación estadística se estableció en $p < 0,05$.

1.2.3. Remodelamiento mitocondrial y de la ECM en el VAT con la edad y la DM2

El análisis de los cambios dinámicos del proteoma del VAT reveló que el remodelamiento mitocondrial y de la ECM fueron procesos comúnmente alterados tanto en DM2 como en envejecimiento. El conjunto de proteínas mitocondriales regulado en DM2 presentaba un grado de coordinación similar al de la comparación de edad (como demuestran sus respectivos desplazamientos de las curvas en las **Figuras 22B y 24B**). Sin embargo, el número de proteínas y funciones que recogía la remodelación mitocondrial en DM2 era superior al de la edad, tal y como puede comprobarse en los listados de categorías para ambas comparaciones (**Tablas 10 y 11, Tablas S11 y S12**). Con el fin de ahondar en las implicaciones que estos cambios coordinados pudieran tener, analizamos los listados de proteínas contenidos por los *cluster* de mitocondria tanto del estudio comparativo de edad (*Cluster 7*) como de DM2 (*Cluster 2*) mediante la herramienta STRING (Szklarczyk et al, 2015). Tal y como esperábamos, el análisis de la red de interacciones de los conjuntos de proteínas demostró que la disfunción mitocondrial

un umbral de confianza $\geq 0,95$. Los colores agrupan los distintos conjuntos de nodos que interaccionan. La línea punteada remarca aquellos nodos que se encontraban exclusivamente regulados en el estudio de DM2. Figura tomada de (Gomez-Serrano et al, 2016).

Hasta la fecha, nuestro estudio fue el primero que cuantificó una caída global de las proteínas mitocondriales en asociación al envejecimiento y la DM2 (Gomez-Serrano et al, 2016), si bien el conjunto de proteínas que se modulaban era distinto en ambas condiciones. En la comparación de edad las alteraciones que detectamos eran básicamente en las proteínas mitocondriales de membrana, destacando aquellas vinculadas al metabolismo energético de OXPHOS; mientras que en el estudio diferencial de DM2 las alteraciones encontradas no solo incluían OXPHOS, sino además otras funciones metabólicas de la mitocondria como el ciclo de Krebs o el catabolismo de BCAAs. La mayor variedad de proteínas y funciones disminuidas en DM2 en comparación a la edad podría explicarse por una alteración de marcadores específicos en pacientes diabéticos, aunque más probablemente podría indicar que los cambios observados reflejen un número reducido de mitocondrias en estos pacientes, como describen otros estudios (Choo et al, 2006; Kelley et al, 2002; Morino et al, 2005; Patti & Corvera, 2010). Por su parte, los cambios asociados al envejecimiento se acotan principalmente a nivel de membrana mitocondrial interna y externa, señalándose en este último caso posibles defectos en la morfología de las mitocondrias (Chen & Chan, 2009; Daum et al, 2013; Miquel et al, 1980).

En el estudio diferencial de edad, la alteración mitocondrial se acompañó de otros fenómenos relacionados con el remodelamiento del tejido adiposo como son un incremento de las proteínas de la ECM, de mediadores de PPAR o una mayor hipertrofia de los adipocitos. Estos cambios reflejarían las primeras fases de IR previas al desarrollo de DM2, como describen otros estudios (Coletta & Mandarino, 2011). En DM2, sin embargo, el espectro de funciones mitocondriales disminuidas era mayor pero se acompañaba de una disminución general de los algunos componentes extracelulares y una caída de mediadores de PPAR. De hecho, el conjunto de proteínas de la ECM regulado en ambos procesos era diferente (**Tablas 10 y 11, Tablas S11 y S12**), tal y como lo avaló también el estudio de su interactoma (**Figura 27**). Además de modularse de forma contraria (esto es, el *cluster* de ECM incrementa con la edad pero disminuye con la DM2, **Figuras 22B y 24B**), el conjunto de proteínas que se modula coordinadamente es ligeramente distinto para cada comparación: por ejemplo, la *vía de señalización de integrinas* está incrementada en el análisis de edad pero no aparece alterada en el de DM2 (**Tablas 10 y 11, Tablas S11 y S12**). Nuestros resultados para DM2 se oponen a la línea general de la mayoría de estudios donde un mayor grado de fibrosis de tejido adiposo se correlaciona positivamente con un mayor grado de inflamación e IR (Divoux et al, 2010; Guglielmi et al, 2015; Henegar et al, 2008). No obstante, un trabajo reciente ha descrito una disminución del depósito de ECM en el VAT de pacientes diabéticos basado en análisis de genómica cuantitativa, IHC y citometría de flujo (Muir et al, 2016). Nuestros datos apoyan el estudio de Muir y col. pese a que nosotros no hayamos encontrado diferencias en la hipertrofia de los adipocitos (lo que podría ser debido a un tamaño muestral pequeño). Diversos estudios señalan que además de la acumulación de ciertas proteínas, la composición y disposición de la ECM juega un

papel esencial en el remodelamiento del tejido adiposo (Divoux & Clement, 2011; Mori et al, 2014). Estas observaciones explicarían las diferencias en la composición de proteínas de la ECM alteradas en los estudios diferenciales de edad y DM2 (**Figura 27**). Sin embargo, debido al diseño transversal de este estudio no pueden establecerse relaciones causales que ayuden a descifrar estas controversias. Por ejemplo, desconocemos si la composición de la ECM en pacientes diabéticos es una causa asociada al desarrollo de la DM2 o por el contrario, una consecuencia, y se observa como respuesta del tejido adiposo tras la aparición de la patología. Estudios longitudinales en diferentes poblaciones de sujetos ayudará a descifrar estas incógnitas en el futuro.

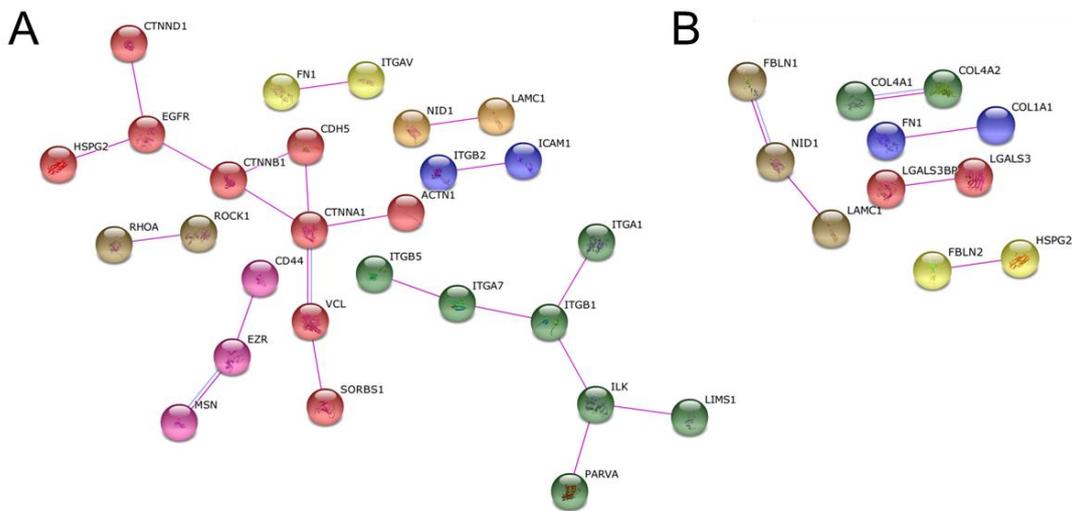


Figura 27 | Análisis de la red de interacciones de las proteínas de la ECM alteradas coordinadamente en los estudios diferenciales de edad y DM2 del VAT. El análisis se llevó a cabo mediante STRING (Szklarczyk et al, 2015). **(A)** Interactoma de las proteínas pertenecientes al *cluster* de ECM en la comparación de edad (n=116). **(B)** Interactoma de las proteínas pertenecientes al *cluster* de ECM en la comparación de DM2 (n=67). Únicamente se muestran aquellas interacciones proteína-proteína validadas experimentalmente bajo un umbral de confianza $\geq 0,95$. Los colores agrupan los distintos conjuntos de nodos que interaccionan.

1.2.4. Dimorfismo sexual del VAT en DM2

Apenas pueden encontrarse estudios proteómicos que hayan evaluado las diferencias en el VAT de pacientes de distinto género (Montes-Nieto et al, 2013; Mukherjee et al, 2012). En esta Tesis Doctoral, los análisis de Biología de Sistemas indicaron que 46 categorías funcionales agrupadas en 8 *clusters* estaban reguladas de forma coordinada (**Figura 28, Tabla 12**). El *cluster* más grande comprendía categorías relacionadas con la *respuesta inmune* (*Cluster 2*) incluyendo proteínas que tendían a estar incrementadas mayoritariamente en mujeres respecto a hombres (**Tabla S13**). Es importante recordar que el grado de coincidencia de DAPs en la comparación de DM2 y género era notable (alrededor de un 33%, **Figura 17**), lo que sugería una gran influencia del sexo sobre el fenotipo diabético. Por tanto, no es

de sorprender que los análisis de cambios proteicos coordinados hayan mostrado que algunas categorías como la *respuesta inmune* estén alteradas en ambas comparaciones (**Tablas 11 y 12**).

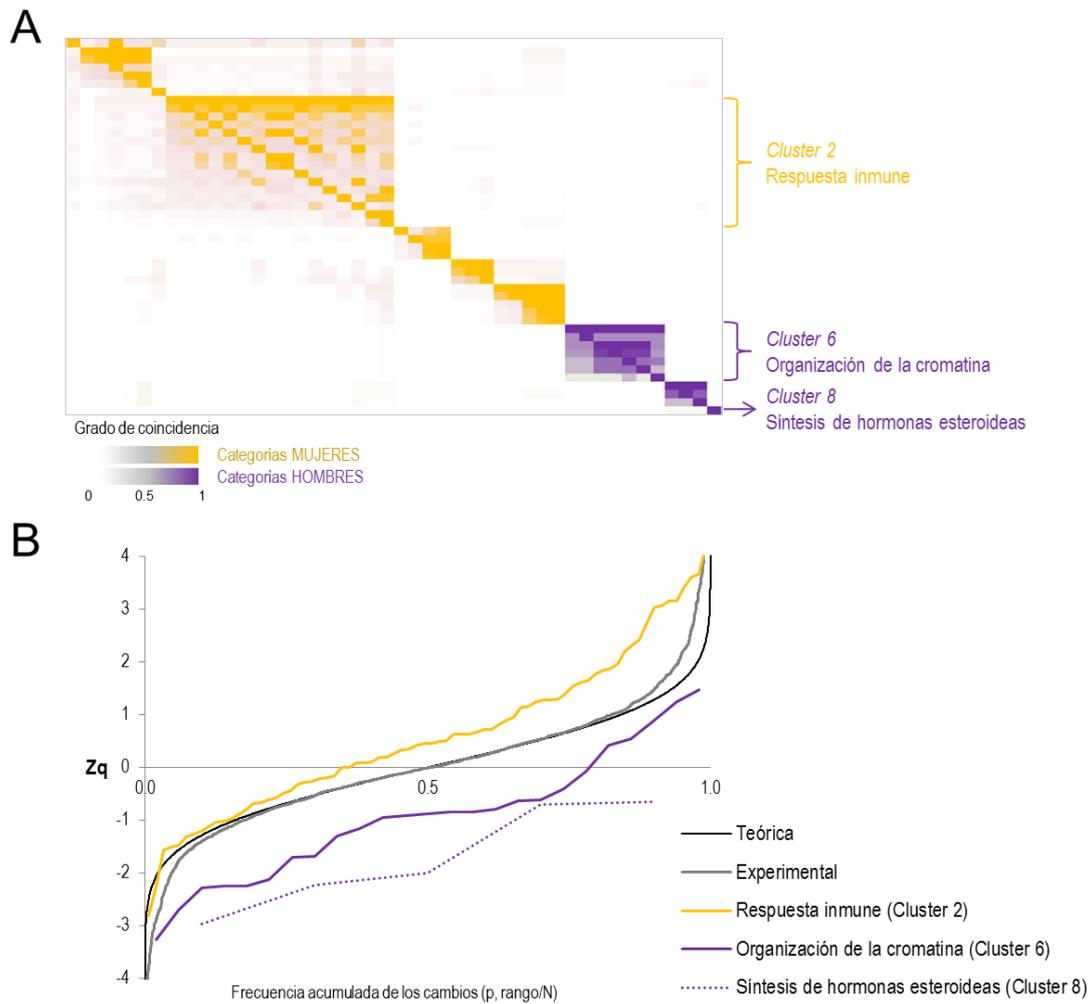


Figura 28 | Cambios proteicos coordinados en el VAT de pacientes obesos con DM2 en función del género.

(A) Agrupamiento de las categorías funcionales alteradas en función del grado de coincidencia de proteínas. Filas y columnas siguen el mismo orden al mostrado en la **Tabla 12**. La escala de color se utilizó para representar aquellas categorías que aumentan en mujeres (amarillo) u hombres (morado) diabéticos. **(B)** Representación del grado de coordinación de los cambios proteicos. El gráfico muestra la frecuencia acumulada de los cambios (valor Zq) para las categorías y *clusters* más representativos (ver **Tabla S13**). Se muestra también la distribución de una curva teórica normal (en negro) así como la distribución de los datos experimentales (línea gris) obtenidos para todo el conjunto de proteínas cuantificadas en el estudio diferencial de género (n=2 371). El desplazamiento respecto a la curva teórica hacia arriba o hacia abajo indica un aumento global de las proteínas que pertenecen a la categoría/*cluster* funcional en mujeres u hombres diabéticos, respectivamente. Figura modificada de (Gomez-Serrano et al, 2016).

Tabla 12 | Cambios proteicos coordinados del VAT en función al género. Categorías funcionales diferencialmente moduladas con $FDR < 0,05$ y $n \geq 5$. **Zc** es el ratio logarítmico estandarizado para cada categoría y **FDRc** su tasa de error asociada. Se ha añadido una escala de color amarillo-morado para representar el incremento de la respuesta en mujeres u hombres, respectivamente. **N** representa el número de proteínas que pertenecen a cada categoría. Para cada *cluster*, se eligieron como representativas las categorías menos redundantes. En gris se indican aquellas representadas en la **Figura 28B**. El listado completo de las proteínas se encuentra en la **Tabla S13**. Tabla modificada de (Gomez-Serrano et al, 2016).

Número cluster	Código categoría	Nombre categoría	Zc	FDRc	N
1	GO:0050777	negative regulation of immune response	3,80	0,01	5
	GO:0032102	negative regulation of response to external stimulus	3,60	0,01	6
	GO:0031348	negative regulation of defense response	4,49	0,00	7
	GO:0048585	negative regulation of response to stimulus	4,00	0,00	14
	GO:0050727	regulation of inflammatory response	4,78	0,00	14
	GO:0032101	regulation of response to external stimulus	5,03	0,00	21
	GO:0002697	regulation of immune effector process	3,07	0,04	16
2	GO:0002455	humoral immune response mediated by circulating immunoglobulin	5,77	0,00	5
	GO:0002541	activation of plasma proteins involved in acute inflammatory response	7,53	0,00	6
	GO:0016064	immunoglobulin mediated immune response	4,20	0,00	9
	GO:0006959	humoral immune response	5,93	0,00	9
	GO:0002250	adaptive immune response	4,34	0,00	10
	GO:0051605	protein maturation by peptide bond cleavage	8,67	0,00	10
	GO:0002253	activation of immune response	3,66	0,01	12
	GO:0002449	lymphocyte mediated immunity	3,62	0,01	13
	GO:0002443	leukocyte mediated immunity	3,42	0,02	15
	GO:0016485	protein processing	7,65	0,00	15
	GO:0050778	positive regulation of immune response	3,63	0,01	16
	GO:0045087	innate immune response	4,07	0,00	18
	GO:0002526	acute inflammatory response	7,88	0,00	20
	GO:0002684	positive regulation of immune system process	3,01	0,05	25
	GO:0006954	inflammatory response	3,76	0,01	42
GO:0006952	defense response	3,01	0,05	76	
3	GO:0045103	intermediate filament-based process	4,26	0,00	6
	GO:0045095	keratin filament	5,92	0,00	9
	GO:0005882	intermediate filament	4,37	0,00	24
	GO:0045111	intermediate filament cytoskeleton	4,33	0,00	25
4	GO:0009582	detection of abiotic stimulus	3,10	0,04	5
	GO:0009581	detection of external stimulus	3,20	0,03	6
	GO:0051606	detection of stimulus	3,23	0,03	9
5	GO:0033189	response to vitamin A	3,41	0,02	7
	GO:0033273	response to vitamin	3,21	0,03	9
	GO:0007584	response to nutrient	3,88	0,00	26
	GO:0031667	response to nutrient levels	3,33	0,02	33

	GO:0009991	response to extracellular stimulus	3,04	0,04	35
6	GO:0000786	nucleosome	-3,91	0,00	16
	GO:0032993	protein-DNA complex	-3,24	0,03	21
	GO:0006334	nucleosome assembly	-3,61	0,01	21
	GO:0034728	nucleosome organization	-3,25	0,03	22
	GO:0006333	chromatin assembly or disassembly	-3,52	0,01	25
	GO:0006323	DNA packaging	-3,60	0,01	25
	GO:0000785	chromatin	-3,46	0,01	31
7	GO:0010811	positive regulation of cell-substrate adhesion	-4,46	0,00	7
	GO:0010810	regulation of cell-substrate adhesion	-4,17	0,00	8
	GO:0045785	positive regulation of cell adhesion	-4,07	0,00	11
8	hsa00140	Steroid hormone biosynthesis	-3,39	0,02	5

A pesar de que una alteración de la respuesta inmune y un incremento del estado pro-inflamatorio se hayan relacionado directamente con la DM2 (Grossmann et al, 2015), nuestros resultados sugieren un papel más importante de esta respuesta en las mujeres. Las diferencias entre sexos en la respuesta inmune se han documentado en diversos campos (Gubbels Bupp, 2015). En particular, las mujeres son más proclives a padecer enfermedades autoinmunes (Fairweather et al, 2008), y en ciertos contextos, las mujeres pueden producir respuestas inmunes más intensas incluso después de la menopausia (Kao et al, 2010). También se han señalado diferencias en la capacidad proliferativa y secretora de las células T (Goetzl et al, 2010), así como ratios de células T CD4/CD8 invertidos en mujeres y hombres de la misma edad (Amadori et al, 1995). Dado que otro de los conjuntos de categorías alteradas era el relacionado con *la regulación de la respuesta inmune (Cluster 1)* (Tabla 12), estas evidencias sugieren que el estudio las distintas poblaciones inmunes en el tejido adiposo y su regulación en hombres y en mujeres permitirá conocer mejor el papel de la inflamación en obesidad y DM2.

Las mujeres presentaron también un incremento de *la respuesta a los niveles de nutrientes (Cluster 5)*, en la que se englobaban algunas proteínas transportadoras como la ceruloplasmina (CP) o la proteína de unión a retinol 4 (RBP4) (Tabla S13). La CP se sintetiza mayoritariamente en el hígado aunque también es una adipoquina cuyos niveles se han relacionado directamente con el grado de obesidad y cáncer (Arner et al, 2014). La CP está implicada en la homeostasis del Fe, de tal manera que en situaciones de deficiencia de este mineral su expresión puede alterarse para compensar la respuesta (Ranganathan et al, 2011). Se sabe que la obesidad se acompaña de un estado de malnutrición general en el que se acentúa la deficiencia de Fe (Zhao et al, 2015). Además, las mujeres manifiestan anemia mucho más frecuentemente que los hombres, de manera que el aumento de proteínas como la CP en mujeres diabéticas podría estar intentando compensar niveles más bajos de Fe. En línea con esta hipótesis “compensatoria” se encuadraría igualmente la RBP4, una proteína transportadora de vitamina A (o retinol) cuya alteración se ha manifestado en obesidad (Pereira et al, 2012; Villaca Chaves et al, 2008). El aumento de RBP4 también se ha documentado en obesidad, enmascarando disminuciones en la señalización del retinol (Trasino et al, 2015). La vitamina A posee un importante efecto inmunorregulador

(García, 2012), lo que nos lleva a proponer que el aumento de la respuesta inmune en mujeres diabéticas pueda venir acompañado de alteraciones en proteínas que intenten compensar un peor estado nutricional y/o metabólico con respecto a los hombres. Paralelamente, la regulación coordinada de otras proteínas relacionadas con el metabolismo de nutrientes podría explicar las diferencias entre sexos en respuesta a dietas de distinta composición y/o de restricción calórica, tal y como han puesto de manifiesto modelos experimentales animales (Mattison et al, 2012; Miersch & Doring, 2013; Solon-Biet et al, 2015; Wang et al, 2013) y algunos estudios en humanos (Tirosh et al, 2015; Westerterp-Plantenga et al, 2009).

En cuanto a las categorías funcionales incrementadas en hombres, destacan aquellas relacionadas con la *organización de la cromatina* (*Cluster 6*) así como el aumento de proteínas relacionadas con la *síntesis de hormonas esteroideas* (*Cluster 8*) (**Figura 28, Tabla 12**). En conjunto, el enriquecimiento de DAPs y los análisis de cambios proteicos coordinados señalaron una plasticidad sexo-dependiente en el tejido adiposo, remarcando el fenotipo androgénico en el VAT de los hombres diabéticos. El tejido adiposo aporta y regula los niveles de hormonas circulantes en el organismo (Kershaw & Flier, 2004; Simpson, 2003); sin embargo, las respuestas provocadas por hormonas específicas tienen distintas implicaciones en un sexo u otro. Por ejemplo, niveles bajos de testosterona se han asociado a un mayor riesgo de IR y DM2 en hombres (Seidell et al, 1990; Tibblin et al, 1996), mientras que en mujeres niveles elevados de andrógenos inducen IR (Polderman et al, 1994) e incrementan el riesgo de DM2 (Ding et al, 2006). Esta especificidad de género se ilustra en el síndrome del ovario poliquístico (PCOS) donde el hiperandrogenismo en las mujeres se relaciona directamente con la IR y el desarrollo de DM2 (Nandi et al, 2014). Nuestros resultados referentes a la *síntesis de hormonas esteroideas* (*Cluster 8*) implicaban el aumento de proteínas de la familia de las aldo-ceto reductasas 1 (AKR1), principalmente los miembros C1, C2 y C3, en hombres (**Tabla S13**). Se ha descrito que algunas isoformas de AKR1C promueven la adipogénesis y el remodelamiento del tejido adiposo tanto en mujeres como en hombres (Blanchette et al, 2005; Blouin et al, 2009; Wake et al, 2007). Curiosamente, el aumento de las enzimas convertidoras de esteroides se acompañó paralelamente de un aumento de proteínas relacionadas con la remodelación de la cromatina (*Cluster 6*) (**Tabla 12**), lo que podría estar reflejando una mayor hiperplasia en hombres respecto a mujeres. Por otro lado, es preciso recordar que en esta Tesis Doctoral se confirmó una mayor abundancia de FASN en mujeres respecto a hombres (**Figura 21**). FASN está directamente implicada en la síntesis de lípidos y se ha asociado desde hace tiempo a una mayor acumulación de VAT (Berndt et al, 2007) así como a un mayor grado de hipertrofia en adipocitos de ratones con IR (Bluher et al, 2002; Bluher et al, 2004). Para comprobar si estos cambios proteómicos podían estar reflejando alteraciones en la celularidad del tejido adiposo entre ambos sexos, analizamos secciones histológicas de VAT en mujeres (n=4, media de edad 50 años) y hombres (n=4, media 49 años) con DM2 (**Figura 29**).

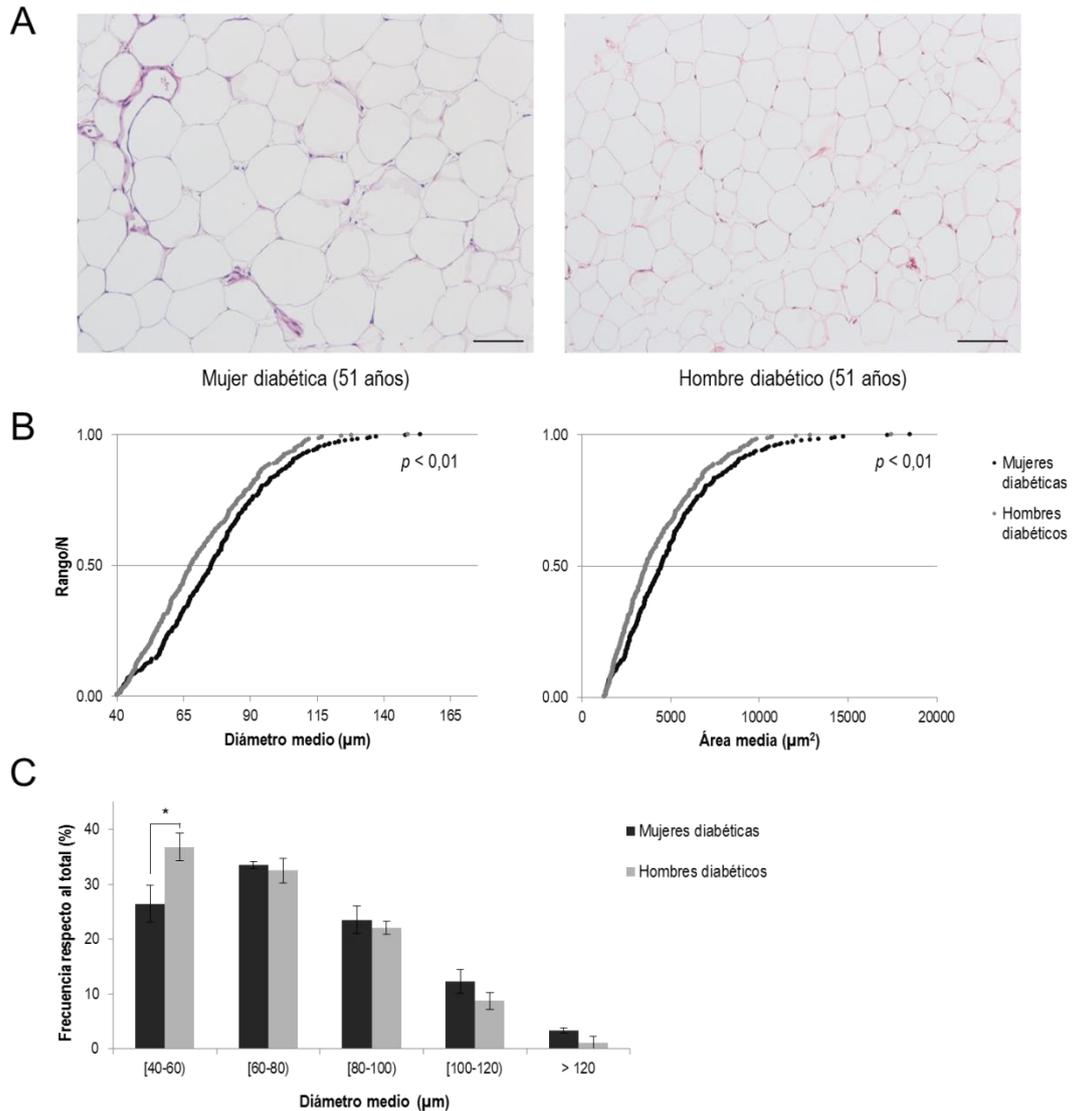


Figura 29 | Evaluación de la celularidad del VAT en relación al género. Las secciones de VAT teñidas con hematoxilina-eosina se analizaron en mujeres (n=4, media de edad 50 años) y hombres (n=4, media 49 años) mediante el *software* Adiposoft (Galarraga et al, 2012). La medida automatizada del tamaño de adipocitos se acotó entre los 40 y 175 μm de diámetro. Todos los pacientes eran obesos con DM2. **(A)** Imágenes representativas a un aumento de 100X. Escala, 100 μm . **(B)** Distribución de los datos para el diámetro medio (μm) y el área media (μm^2) en mujeres (serie negra, n=329) y hombres (serie gris, n=349) de un experimento representativo. **(C)** Frecuencias de adipocitos (%) en función a distintos rangos de diámetro. Las barras representan la media del porcentaje relativo para cada rango \pm DE en mujeres (barras negras) y hombres (barras grises) obtenidas a partir de cuatro experimentos independientes. La significación estadística se estableció en $p < 0,05$. *, $p < 0,05$. Figura modificada de (Gomez-Serrano et al, 2016).

Los adipocitos de las mujeres fueron significativamente más grandes que los de los hombres ya que presentaban mayor área y mayor diámetro equivalente ($p < 0,01$) **(Figura 29B)**. Por otro lado, la fracción de los adipocitos de menor tamaño (aquellos dentro del rango de 40-60 μm de diámetro) fue

significativamente mayor en hombres que en mujeres ($p < 0,05$) (**Figura 29C**), sugiriendo una mayor hiperplasia en los hombres y confirmando nuestra hipótesis.

Las evidencias encontradas en los estudios diferenciales de edad y género respaldan que la alteración de proteínas implicadas en el remodelamiento génico y de enzimas convertidoras de esteroides en el VAT se relaciona estrechamente con la adipogénesis. El aumento de proteínas del metabolismo de esteroides junto con el aumento de proteínas implicadas en la remodelación génica favorecería la hiperplasia. Por el contrario, el aumento de proteínas del metabolismo de esteroides acompañado de una disminución de la remodelación génica favorecería la hipertrofia de los adipocitos (sin hiperplasia).

El VAT de mujeres diabéticas contiene adipocitos más hipertróficos en comparación a los hombres (**Figura 29B**), lo que a su vez se relaciona con un aumento global de proteínas de la respuesta inmune (**Figura 28**). Según estos datos, podríamos decir que una vez que la DM2 se ha establecido las mujeres poseen un tejido adiposo más disfuncional, lo que a su vez podría relacionarse con alteraciones en la vascularización, aumento de hipoxia local, fibrosis y muerte celular (Cao, 2007; Strissel et al, 2007). Dado que este estudio no se trata de un análisis longitudinal, no podemos establecer relaciones de causalidad en las observaciones. Por tanto, nuestros resultados podrían reflejar, o bien que las mujeres obesas necesitan alcanzar un grado de disfuncionalidad mayor en el tejido adiposo antes de desarrollar DM2, o bien que tras desarrollar DM2 los efectos sobre el tejido adiposo son más agresivos en las mujeres que en los hombres. En cualquier caso, y en consonancia a nuestros datos, estudios previos han señalado que las mujeres diabéticas tienen peor control glucémico (Tang et al, 2008) y no mejoran tanto en sus niveles de HbA1c en comparación a los hombres (Wexler et al, 2005), a pesar de demostrar una mayor adherencia al tratamiento de la DM2 (Chiu & Wray, 2011; Shalev et al, 2005). Actualmente las guías y protocolos de tratamiento no distinguen entre sexos, pese a que el dimorfismo sexual en la clínica de la DM2 se haya confirmado recientemente (McGill et al, 2013). Por primera vez, nuestro trabajo puso de manifiesto rasgos específicos en el VAT de mujeres y hombres diabéticos (Gomez-Serrano et al, 2016). Dado que el papel del tejido adiposo es esencial en el control de la homeostasis metabólica, nuestros datos remarcan la necesidad de diseñar terapias adaptadas al género para conseguir mejores resultados en el tratamiento de la DM2 en el futuro.

2. ANÁLISIS DEL PROTEOMA Y REDOXOMA TIÓLICO MITOCONDRIAL DE LOS ADIPOCITOS

La mayoría de las funciones mitocondriales son ubicuas en todos los tejidos, sin embargo también se han descrito funciones y regulación tejido-específicos de la capacidad mitocondrial (Holmstrom et al, 2012; Johnson et al, 2007a; Johnson et al, 2007b). Pese a que el tejido adiposo tenga un papel clave en la regulación del gasto energético y la señalización de la insulina (Kusminski & Scherer, 2012), existe una comprensión limitada de la relevancia de las mitocondrias en este tejido, muy probablemente debido a la escasez del contenido mitocondrial en los adipocitos blancos (Boudina & Graham, 2014).

Estudios anteriores del laboratorio describieron una disminución significativa de las funciones mitocondriales en el VAT de sujetos obesos frente a no obesos (Perez-Perez et al, 2012a). En esta Tesis Doctoral encontramos que la disfunción mitocondrial en el VAT era un rasgo distintivo del envejecimiento y la DM2 (Gomez-Serrano et al, 2016), si bien los cambios proteómicos que englobaban ambas condiciones eran distintos. Con el objetivo de ahondar en la definición de estos patrones decidimos explorar el proteoma mitocondrial de los adipocitos.

2.1. Validación del método

En el momento de desarrollo de esta Tesis Doctoral, tan solo una referencia había abordado el proteoma mitocondrial de adipocitos de ratón utilizando un método genérico de centrifugaciones diferenciales (Forner et al, 2009). Este trabajo, a su vez, estaba basado en estudios previos donde se utilizaban otros tejidos como músculo o hígado (Forner et al, 2006) y no describía las modificaciones llevadas a cabo para los adipocitos. Por estas razones, decidimos aplicar métodos comerciales más actuales y estandarizados. El enriquecimiento mitocondrial se llevó a cabo mediante dos protocolos distintos: uno, basado en el uso de bolas magnéticas MACS (Miltenyc Biotech.), y otro basado en lisis y centrifugaciones diferenciales de la casa comercial Abcam; aunque el método de ruptura de los adipocitos utilizado fue el mismo en ambos casos. La calidad de las mitocondrias obtenidas a partir de ambos métodos se comparó cualitativamente mediante WB (**Figura 30**). Se utilizaron marcadores de membrana externa, de membrana interna y de matriz mitocondrial (**Figura 30A**). También se analizaron marcadores citoplasmáticos, nucleares y de citoesqueleto para estimar el grado de contaminación (**Figura 30B**), comprobándose que el grado de enriquecimiento fue similar entre ambos métodos. Para llevar a cabo el análisis mediante LC-MS, decidimos que el protocolo de extracción fuera el de MACS, ya que en este caso la muestra quedaba más libre de grasa y mostraba una menor contaminación nuclear (**Figura 30B**). Por su parte, el protocolo de Abcam ofrecía un rendimiento equiparable al de MACS pero con una mejora en los tiempos de manipulación y adquisición de los extractos. Por ello, decidimos utilizar el protocolo de Abcam para realizar el resto de experimentos, utilizándolo como método de validación.

El grado de enriquecimiento y de pureza de los extractos de proteínas mitocondriales respecto a sus muestras de origen (adipocitos aislados) se evaluó cuantitativamente por LC-MS (**Figura 31**). El grado de pureza mitocondrial de los extractos enriquecidos rondaba el 40-55%, resultado que podría

parecer insuficiente si no tuviéramos en cuenta que la muestra de partida (los adipocitos) contenía una masa proteica mitocondrial en torno al 8-10% (**Figura 31A**). Estos datos confirmaron el escaso contenido mitocondrial de los adipocitos humanos procedentes tanto del VAT como del SAT, e indicaban que la muestra mitocondrial estaba enriquecida de 4 a 5 veces respecto a la muestra de adipocitos (**Figura 31B**). Aunque los resultados fueron satisfactorios con las muestras procedentes de ambos tejidos, el análisis proteómico se realizó únicamente para muestras de VAT, siguiendo con la línea del trabajo anterior (Gomez-Serrano et al, 2016). Finalmente, la integridad de las mitocondrias aisladas se verificó mediante microscopía electrónica (**Figura 32**).

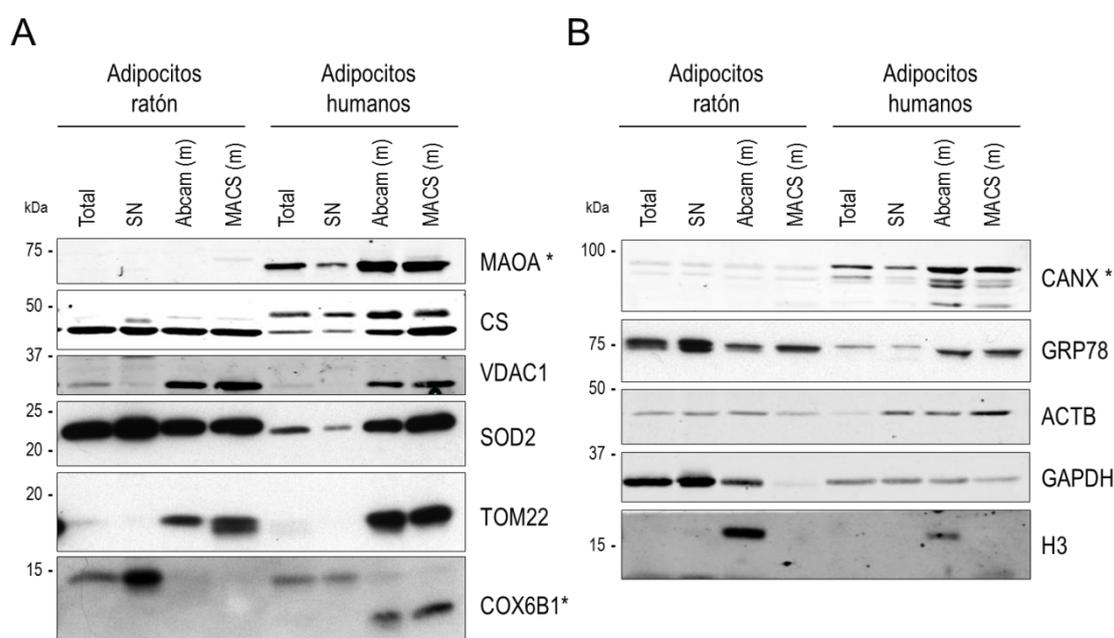


Figura 30 | Análisis cualitativo de los métodos de aislamiento de mitocondrias empleados en la presente Tesis Doctoral. La figura muestra un análisis por WB de proteínas de adipocitos murinos (obtenidos a partir de tejido adiposo epididimal de ratones Bcl-2) y adipocitos humanos (de VAT), así como de sus mitocondrias (m) enriquecidas tanto por el método de Abcam como por la tecnología MACS. Se compararon los extractos de adipocitos totales, el sobrenadante (que se descarta) por el método Abcam (SN) junto con los dos tipos de muestras de mitocondrias (m) enriquecidas. **(A)** Detección de marcadores mitocondriales. Se escogieron como proteínas representativas MAOA (monoamino oxidasa A), CS (citrito sintasa), VDAC1 (canal de intercambio aniónico dependiente de voltaje 1 o porina 1), SOD2 (superóxido dismutasa mitocondrial), TOM22 (subunidad de 22 kDa de la translocasa de la membrana mitocondrial externa) y COX6B1 (subunidad 6B1 de la citocromo c oxidasa). **(B)** Detección de marcadores no mitocondriales. Se escogieron como proteínas representativas CANX (calnexina), GRP78 (proteína regulada por glucosa de 78 kDa), ACTB (β -actina), GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) y la histona H3. La figura muestra imágenes representativas de dos experimentos independientes. **kDa**, peso molecular de las distintas bandas; *, proteínas que fueron únicamente detectadas en muestras humanas debido a que los anticuerpos utilizados no reconocían la proteína de ratón.

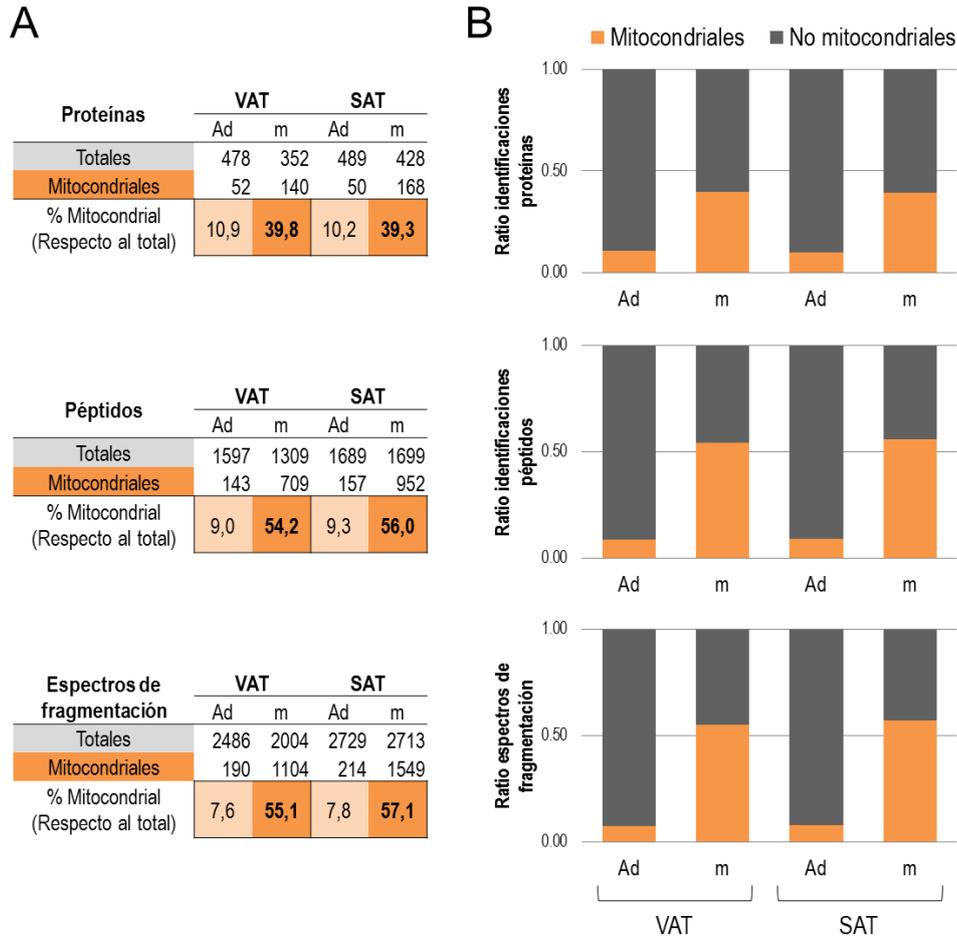


Figura 31 | Cuantificación del grado de enriquecimiento mitocondrial. Se examinó mediante LC-MS el contenido proteico en muestras de adipocitos totales (Ad) y las respectivas mitocondrias aisladas con la tecnología MACS (m) de VAT y SAT. **(A)** Datos crudos de identificación de proteínas, péptidos y espectros de fragmentación (FDR 1%) en extractos de adipocitos y mitocondrias. Se muestra el correspondiente número de identificaciones mitocondriales de acuerdo a la base de datos GO *mitochondrion* (GO:0005739). **(B)** Ratio obtenido para las identificaciones mitocondriales (barras naranja) y las no mitocondriales (barras grises).

2.2. Identificación del proteoma mitocondrial de los adipocitos humanos

Para el estudio proteómico mitocondrial, se utilizaron las muestras de adipocitos aislados procedentes de los grupos de mujeres obesas no diabéticas menores de 35 años (n=4), obesas no diabéticas mayores de 45 años (n=4) y obesas diabéticas mayores de 45 años (n=4) (**Figura 7, Tabla 3**). A partir de esos adipocitos, se aislaron las mitocondrias y se procesaron como se describe en los Materiales y Métodos (secciones 2 y 5, **Figura 10**). A partir de los extractos procedentes de las mitocondrias aisladas de las 12 pacientes implicadas, los análisis de HPLC-MS identificaron 27 578 péptidos bajo una FDR 1% (**Tabla S14**) correspondientes a un total de 3 542 proteínas codificadas por 3 306 genes (**Tabla S15**).

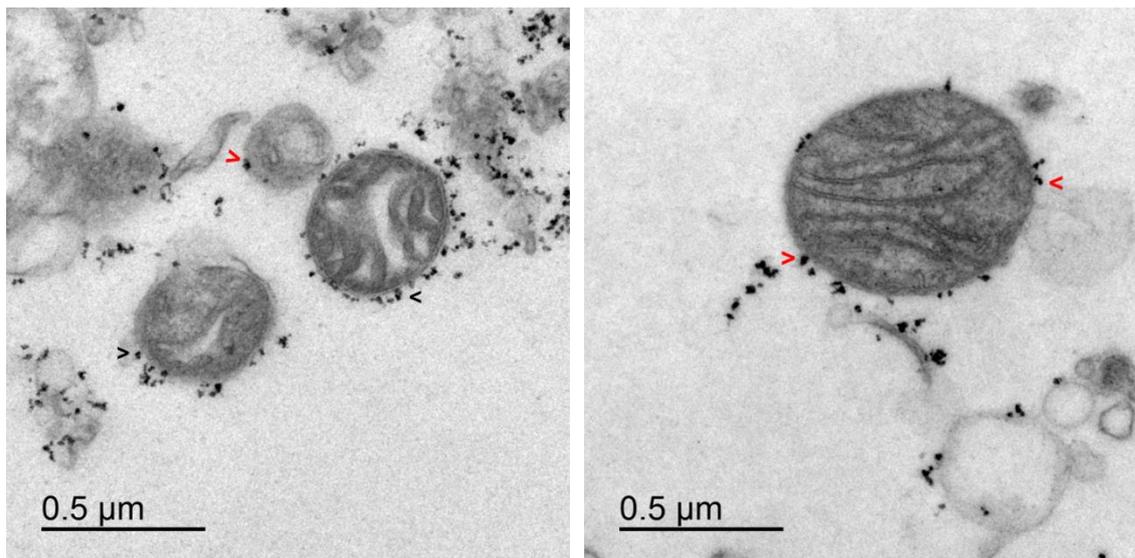


Figura 32 | Análisis por microscopía electrónica. Las muestras de mitocondrias obtenidas mediante la tecnología MACS fueron analizadas mediante microscopía electrónica de transmisión. Se comprobó la integridad de las membranas mitocondriales y el reconocimiento de la membrana externa por parte de las microbolas magnéticas anti-TOM22 (cabezas de flecha). Se observó la coexistencia de otros orgánulos vesiculares tales como lisosomas o restos de retículo endoplásmico. La figura muestra imágenes representativas de tres experimentos independientes. Figura tomada de (Gomez-Serrano et al, 2017).

Al comienzo de esta Tesis Doctoral, el compendio de anotaciones mitocondriales más conocido y exhaustivo era el *Human MitoCarta* (Pagliarini et al, 2008). Esta base de datos se actualizó en enero de 2016 y cuenta ya con un total de 1 158 proteínas anotadas, ofreciendo datos de expresión para 14 tejidos de ratón (Calvo et al, 2016). Nuestro análisis identificó 841 proteínas de las anotadas en el *Human MitoCarta v2.0*, cubriendo más del 88% del proteoma mitocondrial determinado específicamente para tejido adiposo (Calvo et al, 2016).

Antes de proceder al análisis cuantitativo, todas las proteínas no mitocondriales co-identificadas se excluyeron del análisis basándonos, en primer lugar, en la base de datos *Human MitoCarta v2.0* así como en la anotación GO *mitochondrion* (GO:0005739). No obstante, a menudo las categorías funcionales reflejan anotaciones no experimentales basadas en predicciones *in silico* (Smith & Robinson, 2016). Por ello, en segundo lugar, realizamos una curación manual de todas las proteínas identificadas como potencialmente mitocondriales (n=1 098) basándonos en sus funciones canónicas (anotadas en UniProt, <http://www.uniprot.org/>) así como otras fuentes de evidencia como el *Human Protein Atlas* (<http://www.proteinatlas.org/>) (Uhlen et al, 2015). Finalmente, el proteoma mitocondrial de los adipocitos del VAT quedó conformado por un total de 706 proteínas *bona fide* (**Figura 33A**) que serían cuantificadas en una etapa posterior. Es preciso destacar que gran cantidad de las proteínas cuya anotación mitocondrial era equívoca pertenecían al metabolismo lipídico (como por ejemplo FASN). Esto tenía especial relevancia en nuestra muestra, ya que las proteínas del metabolismo de ácidos grasos y lípidos

poseen especial representación en el tejido adiposo (Gomez-Serrano et al, 2016; Kim et al, 2014; Perez-Perez et al, 2012a). En caso de no haber hecho este cribado, pequeñas diferencias en el grado de contaminación de la muestra mitocondrial en los distintos grupos hubieran acarreado grandes diferencias en la distribución normalizada de los datos que iban a compararse, comprometiendo la veracidad de los resultados.

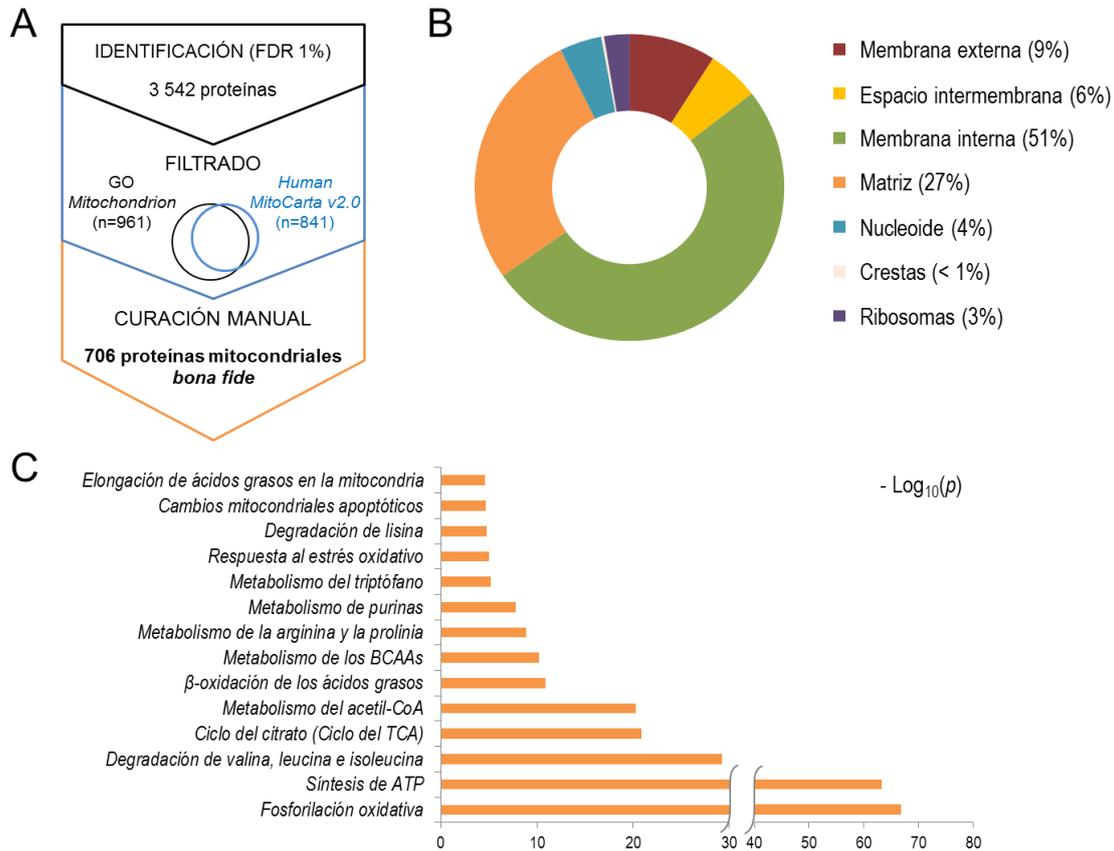


Figura 33 | El proteoma mitocondrial de los adipocitos humanos. (A) Análisis de las proteínas identificadas mediante HPLC-MS. Todas las proteínas no mitocondriales se excluyeron. El listado inicial se filtró de acuerdo a las anotaciones contenidas en la base de datos de *Human MitoCarta v2.0* y *GO mitochondrion*, y después se curaron manualmente. (B) Distribución relativa de las 706 proteínas *bona fide* en los principales compartimentos subcelulares de la mitocondria. (C) Análisis de enriquecimiento de los principales procesos biológicos. Las barras representan el $-\text{Log}_{10}(p)$, donde p se refiere al p valor obtenido para el enriquecimiento. Se muestran funciones representativas. La **Tabla S16** contiene el total categorías funcionales enriquecidas con $p < 0,05$. Paneles **A** y **B** tomados de (Gomez-Serrano et al, 2017).

La distribución del contenido proteico en los principales compartimentos del orgánulo confirmó que el proteoma definido era consistente (**Figura 33B**), de acuerdo a lo esperado (Alberts et al, 2002). Es importante resaltar que 12 de las 13 proteínas codificadas por ADNmt se detectaron pese a su fuerte carácter hidrofóbico (**Tabla S15**), lo que remarca la calidad del proceso de extracción de proteínas. Con el

objetivo de conocer las funciones biológicas destacadas en las mitocondrias de los adipocitos, realizamos un análisis de enriquecimiento de las 706 proteínas mediante DAVID (**Tabla S16**). Los resultados mostraron que la *fosforilación oxidativa* y la *síntesis de ATP* destacaban frente al resto de funciones, aunque el metabolismo de diversos aminoácidos también contaba con una fuerte representación (**Figura 33C**). Otra de las funciones significativamente representada fue la elongación de ácidos grasos en la mitocondria, una ruta que se considera una reminiscencia del pasado procariota de este orgánulo (Autio et al, 2008; White et al, 2005). Esta ruta se ha estudiado especialmente en levaduras (Hiltunen et al, 2010), y aunque su funcionalidad sigue siendo un enigma, se ha comprobado que defectos en esta vía comprometen el metabolismo energético de la mitocondria (Hiltunen et al, 2009). Nuestro estudio identificó proteínas, como la *trans-2-enoyl-CoA reductase* (MERC), implicadas directamente en esta vía, lo que señala un posible papel regulador en el metabolismo de los adipocitos.

Hasta la fecha, son pocos los estudios que han abordado directamente el proteoma mitocondrial humano (Dai et al, 2010; Goudarzi et al, 2011; Lindinger et al, 2015; Rabilloud et al, 1998; Taylor et al, 2003). Sin embargo, durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral se publicó el que estudiaba por primera vez el proteoma mitocondrial de los adipocitos viscerales humanos (Lindinger et al, 2015). La **Tabla 13** resume los aspectos generales del trabajo citado y los compara con los llevados a cabo en la presente Tesis Doctoral (Gomez-Serrano et al, 2017). Lo más llamativo es el número de proteínas mitocondriales identificadas: en el caso de Lindinger y col. se encontraron 62 proteínas, mientras que en el trabajo aquí expuesto fueron 706. Además, la cuantificación y validación de los resultados de su investigación se llevó a cabo mediante métodos indirectos (**Tabla 13**). El número de proteínas identificado en nuestro estudio fue similar al encontrado por Goudarzi y col., que utilizaba extractos de mitocondria humana de corazón (Goudarzi et al, 2011), no obstante, estos autores no mencionaron ningún tipo de filtrado ni cribado, por lo que entre sus proteínas identificadas también se encuentran las de otros orgánulos.

A partir de los datos anteriormente expuestos, se puede concluir que nuestro estudio describió el proteoma humano mitocondrial más completo (n=706), a pesar de haber utilizado criterios rigurosos en la identificación de péptidos (FDR 1%) y de haber realizado un filtrado y curación manual de los datos. Por estas razones, creemos que destaca la significación de nuestros resultados, especialmente en el contexto del tejido adiposo y la obesidad.

2.3. Análisis de los cambios en la abundancia de proteínas: identificación de DAPs y cambios proteicos coordinados

El esquema comparativo que se siguió para evaluar los cambios asociados al envejecimiento y la DM2 fue el mismo que el llevado a cabo en el estudio del VAT. Por un lado, la comparación entre las pacientes no diabéticas mayores de 45 años vs. menores de 35 años informó de las diferencias asociadas a la edad y, por otro, la comparación entre las obesas diabéticas vs. no diabéticas indicó las diferencias relacionadas con el desarrollo de DM2 (**Figura 7**).

Tabla 13 | Estudios proteómicos de mitocondrias de adipocitos del VAT humano. Lindinger y col. publicaron el primer análisis del proteoma de mitocondrias de adipocitos humanos (Lindinger et al, 2015) durante el desarrollo del presente trabajo de Tesis Doctoral (Gomez-Serrano et al, 2017). Comparación de los aspectos generales de ambos estudios.

	Lindinger et al. 2015	Gómez-Serrano et al. 2017
Objetivo	Estudio diferencial de obesidad	Estudio diferencial de envejecimiento y DM2 (en un contexto de obesidad)
Proteomas analizados	20	12
Cantidad de muestra	1 mg por paciente	15 µg por paciente
Clínica de los pacientes	Las diferencias en IMC se acompañan de otras diferencias significativas (por ejemplo, la edad)	Grupos homogéneos: diferencias asumibles únicamente a la edad o a la DM2, en sus respectivos casos
Abordaje proteómico durante la identificación	SDS-PAGE + MALDI	HPLC-MS
Técnica de cuantificación	No	iTRAQ
Validación	76 pacientes Inmunodetección + Análisis estadístico de regresión lineal	20 pacientes (distintos a la cohorte original) WB, ensayos enzimáticos, BN-PAGE
Proteoma mitocondrial	62 proteínas	706 proteínas <i>bona fide</i>
Normalización de los datos	No cita ninguna normalización	Análisis proteómico: modelo WSPP y SBT. Validaciones por WB, BN-PAGE y ensayos enzimáticos: detección de VDAC1 y mg de proteína total
Estudio Redox	No	Sí, y además se acompaña de cuantificación

Los datos del análisis iTRAQ/HPLC-MS correspondientes a las 706 proteínas mitocondriales *bona fide* se analizaron bajo el modelo estadístico WSPP. Es importante recordar que los datos derivados de péptidos con Cys no fueron considerados en el cálculo de la abundancia de las proteínas por contener modificaciones variables, de acuerdo al método previamente descrito (Martinez-Acedo et al, 2012). Una vez realizada la estimación de la abundancia para las 706 proteínas, se comprobó que los datos se ajustaban a una distribución normal en ambas comparaciones (**Figura 34**). En línea con el trabajo desarrollado en esta Tesis Doctoral, las proteínas con $|Zq| \geq 2$ (correspondientes a $p < 0,05$) se consideraron DAPs. Se detectaron un total de 63 y 62 DAPs mitocondriales en los estudios diferenciales de edad y DM2, respectivamente (**Tabla S17**). El 37% de las DAPs fueron comunes a ambas comparaciones, una cifra ligeramente superior a la encontrada en el estudio del proteoma del tejido adiposo (Gomez-Serrano et al, 2016), lo que remarca los rasgos compartidos entre el envejecimiento y la DM2 en el remodelamiento mitocondrial. Una de las proteínas que ejemplifica esta relación es la

subunidad 6B1 de la citocromo c oxidasa (COX6B1), cuya abundancia se encontró disminuida en el estudio comparativo de edad ($Zq = -2.75$) y de DM2 ($Zq = -5.06$) (Tabla S17).

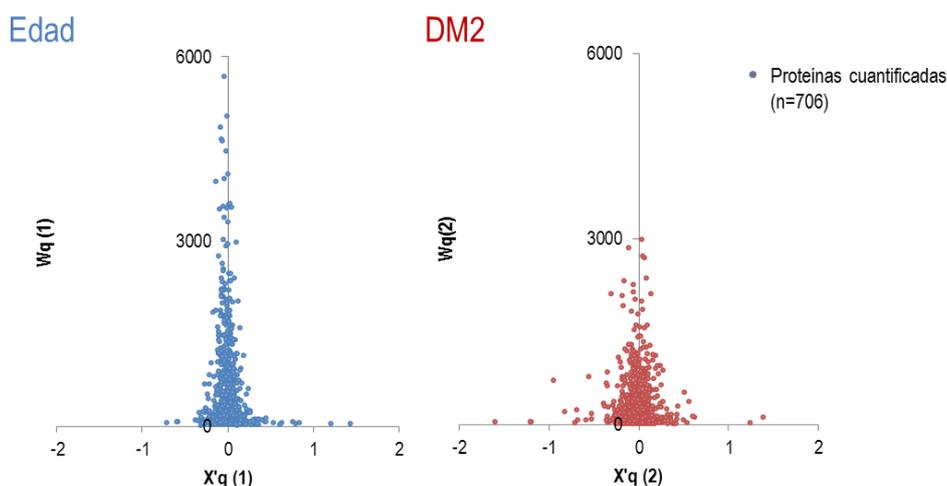


Figura 34 | Distribución normal de los datos de cuantificación del proteoma mitocondrial. Gráficos de puntos que muestran los valores $X'q$ (\log_2 de la media corregida para cada proteína) respecto a Wq (peso estadístico de la proteína) en cada una de las comparaciones: edad (1, puntos azules) y DM2 (2, puntos rojos). El modelo WSPP trabaja bajo la hipótesis de normalidad de manera que los datos deben ajustarse a una distribución gaussiana.

Para el estudio del proteoma mitocondrial, decidimos descartar los análisis de enriquecimiento de DAPs ya que el número de proteínas no era suficiente (mucho menor de 100) y se habría sobreestimado la significación de los resultados (Huang da et al, 2009b). Así, el examen individual de DAPs quedó relegado a la ejemplificación de los cambios proteicos coordinados que se encontraron, como se describirá a continuación.

2.3.1. Cambios dinámicos del proteoma mitocondrial con el envejecimiento

El análisis de Biología de Sistemas desveló que el *metabolismo de la vitamina D* estaba aumentado en las obesas de mayor edad respecto a las de menor edad (Figura 35, Tabla 14). La vitamina D es una hormona esteroidea con acciones pleiotrópicas en el organismo que incluyen la mineralización ósea, la homeostasis del calcio y del fosfato, la diferenciación de células del sistema inmune y la inhibición tumoral, entre otras (Feldman et al, 2014). La deficiencia de vitamina D se ha asociado a diversas patologías relacionadas con el envejecimiento tales como IR, DM2, ECV, enfermedades neurodegenerativas y cáncer (Chiu et al, 2004; Feldman et al, 2014; Keeney & Butterfield, 2015; Mozos & Marginean, 2015). Los individuos obesos presentan niveles reducidos de vitamina D en sangre aunque no existe consenso acerca de las causas que propician este fenómeno (Drincic et al, 2012; Wortsman et al, 2000).

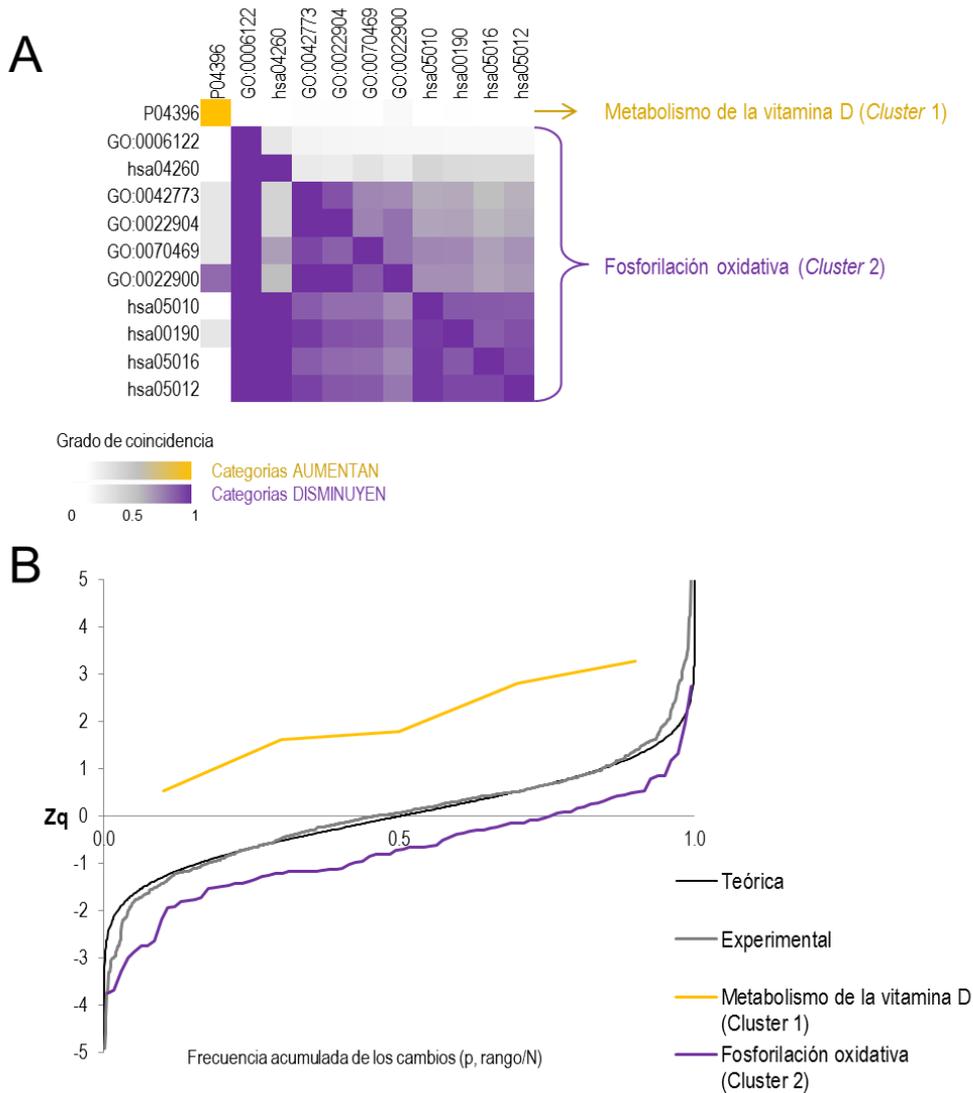


Figura 35 | Cambios proteicos coordinados en las mitocondrias de pacientes obesos en función de la edad. (A) Agrupamiento de las categorías funcionales alteradas en función del grado de coincidencia de proteínas. Filas y columnas siguen el mismo orden al mostrado en la **Tabla 14**. La escala de color amarillo-morado se utilizó para representar aquellas categorías que aumentan y disminuyen con la edad, respectivamente. (B) Representación del grado de coordinación de los cambios proteicos. El gráfico muestra la frecuencia acumulada de los cambios (valor Zq) para las categorías más representativas (ver **Tabla S18**). Se muestra también la distribución de la curva teórica normal (en negro) así como la distribución de los datos experimentales (línea gris) obtenidos para todo el conjunto de proteínas cuantificadas en el estudio diferencial de edad (n=706). El desplazamiento respecto a la curva teórica hacia arriba o hacia abajo indica un aumento o disminución global de las proteínas que pertenecen a la categoría/cluster funcional en mujeres obesas mayores de 45 años vs. menores de 35 años, respectivamente. Figura tomada de (Gomez-Serrano et al, 2017).

Tabla 14 | Cambios proteicos coordinados en el proteoma mitocondrial en función de la edad. Categorías funcionales diferencialmente moduladas con $FDR < 0,05$ y $n \geq 5$. Z_c es el ratio logarítmico estandarizado para cada categoría y FDR_c su tasa de error asociada. Se ha añadido una escala de color amarillo-morado para representar el incremento o disminución de la respuesta con la edad, respectivamente. N representa el número de proteínas que pertenecen a cada categoría. Para cada *cluster*, se eligieron como representativas las categorías menos redundantes (indicadas en gris y representadas en la **Figura 35B**). El listado completo de las proteínas se encuentra en la **Tabla S18**. Tabla tomada de (Gomez-Serrano et al, 2017).

Número cluster	Código categoría	Nombre categoría	Zc	FDRc	N
1	P04396	Vitamin D metabolism and pathway	4,58	0,00	5
2	GO:0006122	mitochondrial electron transport, ubiquinol to cytochrome c	-3,69	0,02	5
	hsa04260	Cardiac muscle contraction	-4,56	0,00	26
	GO:0042773	ATP synthesis coupled electron transport	-4,14	0,01	53
	GO:0022904	respiratory electron transport chain	-3,92	0,01	60
	GO:0070469	respiratory chain	-4,17	0,01	70
	hsa05010	Alzheimer's disease	-3,73	0,02	79
	hsa00190	Oxidative phosphorylation	-3,82	0,01	88
	GO:0022900	electron transport chain	-3,68	0,02	77
	hsa05016	Huntington's disease	-4,07	0,01	90
hsa05012	Parkinson's disease	-4,11	0,01	91	

Para ejercer su función, la vitamina D necesita ser hidroxilada, lo que da lugar a su forma biológicamente activa: la $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D_3 ($1,25(OH)_2D_3$). Nuestros datos indicaron que el aumento del *metabolismo de la vitamina D* estaba representado por proteínas como *mitochondrial sterol-26 hydroxylase* (CYP27A1, $Z_q = 3.29$) o la adrenoxina (FDX1, $Z_q = 2.82$) (**Tabla S18**). Se han descrito diversas actividades vitamina D hidroxilasa para la CYP27A1 (Araya et al, 2003); sin embargo, parece ser que esta proteína tiene poca relevancia en la activación de la vitamina D y se le ha atribuido un papel más importante en el metabolismo de los ácidos biliares y de ciertas hormonas sexuales (Jones & Prosser, 2011). De hecho, alteraciones en la actividad de CYP27A1 podrían desregular el metabolismo de los ácidos biliares, favoreciendo una malabsorción de vitamina D (Bjorkhem & Hansson, 2010). Además, la CYP27A1 convierte el colesterol en 27α -hidroxicolesterol, un metabolito que impide la inactivación de la progesterona a 20α -DH-progesterona, y esta acción se ve favorecida en presencia de FDX1 (Escher et al, 2009). Niveles elevados de 27α -hidroxicolesterol se han asociado con un mayor grado de metástasis en modelos murinos de cáncer de mama y un mayor tamaño de estos tumores en pacientes (Nelson et al, 2013). Por tanto, nuestros datos sugieren que la alteración de proteínas como CYP27A1 o FDX1 en las mitocondrias de adipocitos de mujeres obesas podría tener importantes consecuencias sistémicas, modulando la acción de la vitamina D y/o de las hormonas sexuales durante el envejecimiento.

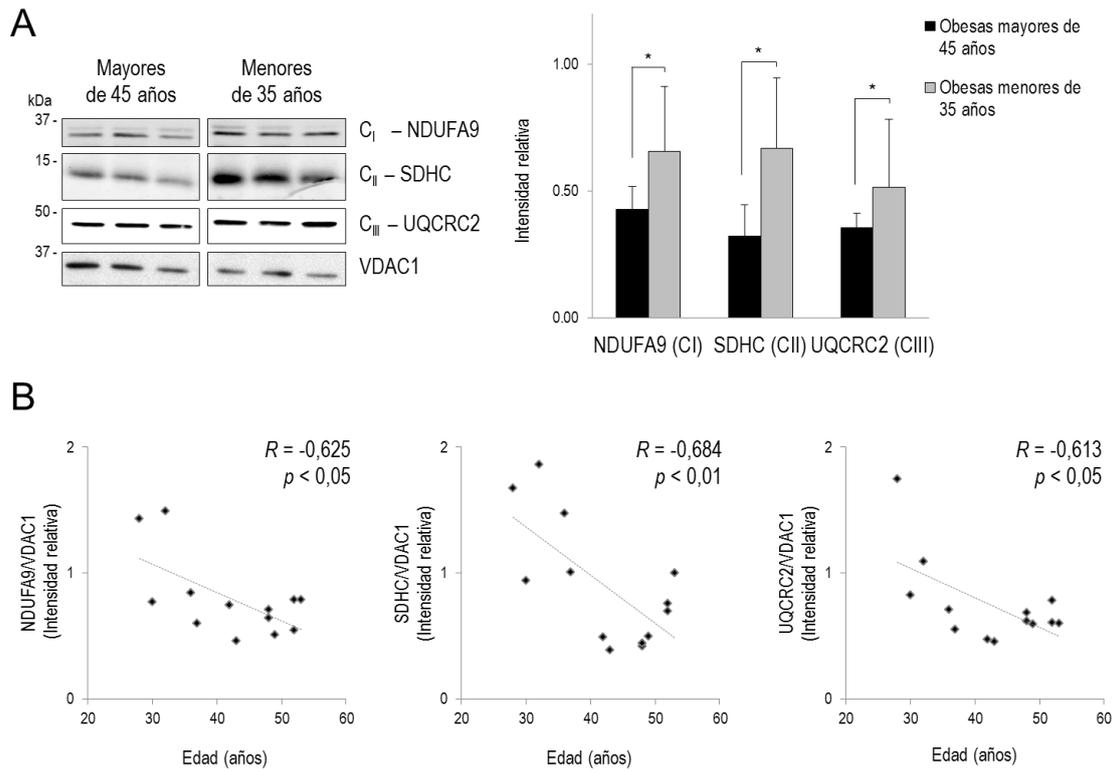


Figura 36 | Análisis de marcadores OXPHOS para la validación de los cambios coordinados en el proteoma mitocondrial del estudio comparativo de edad. (A) Imágenes representativas de marcadores seleccionados que se analizaron mediante WB en un conjunto independiente de muestras de mitocondrias procedentes de pacientes no diabéticas de mayor (n=7, media 49 años) y menor edad (n=6, media 34 años). Los gráficos de barras muestran los valores de intensidad relativa como medias \pm DE para cada grupo. La significación estadística se evaluó mediante la prueba t de Student. **(B)** Análisis de correlación (Pearson) de los valores de intensidad relativa de cada marcador respecto a la edad de los pacientes. Todos los resultados se normalizaron con los datos obtenidos para VDAC1 (canal de intercambio aniónico dependiente de voltaje 1). La significación estadística se estableció en $p < 0,05$. **kDa**, peso molecular de las distintas bandas; *, $p < 0,05$. Panel **A** tomado de (Gomez-Serrano et al, 2017).

El análisis de Biología de Sistemas detectó que la caída de las proteínas implicadas en la *fosforilación oxidativa* era el cambio más significativo en el estudio de edad (**Figura 35, Tabla 14**). La disminución de marcadores de OXPHOS en obesas de mayor edad se validó mediante WB en un conjunto independiente de pacientes (**Figura 36A**). Además se detectó una correlación negativa entre la abundancia de estos marcadores y la edad de los pacientes (**Figura 36B**). En conjunto, nuestros datos confirmaron una caída global de proteínas OXPHOS en mitocondrias aisladas con el envejecimiento, que previamente habíamos observado también a nivel de tejido adiposo total (Gomez-Serrano et al, 2016), y en la que se profundizará más adelante.

2.3.2. Cambios dinámicos del proteoma mitocondrial con la DM2

En el estudio diferencial de DM2, los análisis de cambios proteicos coordinados destacaron un aumento de la *respuesta a los niveles de oxígeno* y del *metabolismo de derivados de aminoácidos*, así como una disminución de la *cascada de señalización intracelular* (**Figura 37, Tabla 15**).

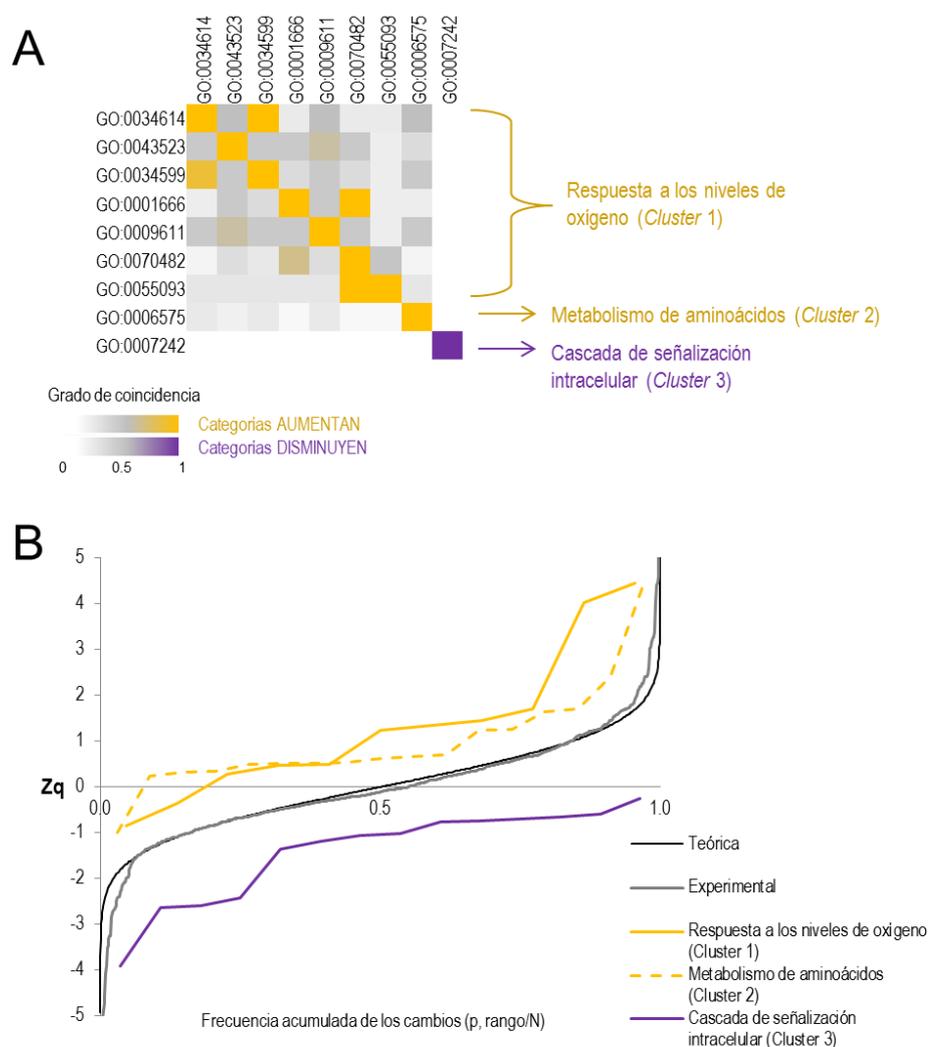


Figura 37 | Cambios proteicos coordinados en las mitocondrias de pacientes obesos asociadas a la DM2. (A) Agrupamiento de las categorías funcionales alteradas en función del grado de coincidencia de proteínas. Filas y columnas siguen el mismo orden al mostrado en la **Tabla 15**. La escala de color amarillo-morado se utilizó para representar aquellas categorías que aumentan y disminuyen con la DM2, respectivamente. **(B)** Representación del grado de coordinación de los cambios proteicos. El gráfico muestra la frecuencia acumulada de los cambios (valor Zq) para las categorías y *clusters* más representativos (ver **Tabla S19**). Se muestra también la distribución de la curva teórica normal (en negro) así como la distribución de los datos experimentales (línea gris) obtenidos para todo el conjunto de proteínas cuantificadas en el estudio diferencial de DM2 (n=706). El desplazamiento respecto a la curva teórica hacia arriba o hacia abajo indica un aumento o disminución global de las proteínas que pertenecen a la categoría/*cluster* funcional en mujeres obesas diabéticas vs. no diabéticas, respectivamente. Figura tomada de (Gomez-Serrano et al, 2017).

Tabla 15 | Cambios proteicos coordinados en el proteoma mitocondrial en relación a la DM2. Categorías funcionales diferencialmente moduladas con $FDR < 0,05$ y $n \geq 5$. **Zc** es el ratio logarítmico estandarizado para cada categoría y **FDRc** su tasa de error asociada. Se ha añadido una escala de color amarillo-morado para representar el incremento o disminución de la respuesta en pacientes diabéticos, respectivamente. **N** representa el número de proteínas que pertenecen a cada categoría. Para cada *cluster*, se eligieron como representativas las categorías menos redundantes (indicadas en gris y representadas en la **Figura 37B**). El listado completo de las proteínas se encuentra en la **Tabla S19**. Tabla tomada de (Gomez-Serrano et al, 2017).

Número <i>cluster</i>	Código categoría	Nombre categoría	Zc	FDRc	N
1	GO:0034614	cellular response to reactive oxygen species	3.52	0.02	6
	GO:0043523	regulation of neuron apoptosis	3.47	0.03	7
	GO:0034599	cellular response to oxidative stress	3.80	0.01	7
	GO:0001666	response to hypoxia	3.99	0.01	7
	GO:0009611	response to wounding	4.72	0.00	7
	GO:0070482	response to oxygen levels	4.32	0.00	11
	GO:0055093	response to hyperoxia	4.13	0.00	5
2	GO:0006575	cellular amino acid derivative metabolic process	3.35	0.04	17
3	GO:0007242	intracellular signaling cascade	-4.28	0.00	14

La respuesta a los niveles de oxígeno estaba representada por componentes de la maquinaria antioxidante como la SOD mitocondrial (SOD2) y la tiorredoxina (TXN2) (**Tabla S19**), las cuales mostraron un incremento significativo en obesas no diabéticas de mayor edad respecto a las de menor edad ($Zq = 4,45$ y $Zq = 4,02$, respectivamente). SOD2 es una enzima “limpiadora” (*scavenging*) esencial en la eliminación del radical superóxido en la matriz mitocondrial para convertirlo en H_2O_2 y oxígeno (Fridovich, 1999) y la TXN2 detoxifica los peróxidos y reduce los enlaces disulfuros y sulfóxidos de residuos de metionina (Powis & Montfort, 2001). A simple vista, estos resultados parecen estar en contraposición a lo establecido, ya que el desarrollo de patologías como la DM2 se ha asociado a la disminución de la acción antioxidante y un mayor estrés oxidativo (Banerjee & Vats, 2014; Liu et al, 2013). Sin embargo, el análisis mediante WB de un conjunto independiente de pacientes confirmó que los niveles de SOD2 estaban aumentados en las mitocondrias aisladas de obesas diabéticas frente a no diabéticas (**Figura 38**), apoyando algunos estudios previos (Aguer et al, 2013; Han et al, 2016) y nuestros datos proteómicos.

De acuerdo a los análisis de clasificación, SOD2 también formaba parte de los cambios coordinados del *metabolismo de derivados de aminoácidos* (**Tabla S19**), que estaba significativamente aumentado en mujeres con DM2 (**Figura 37, Tabla 15**). Según el término GO, esta ruta engloba reacciones químicas que implican a compuestos derivados de aminoácidos o ácidos orgánicos que contienen uno o más sustituyentes amino (Ashburner et al, 2000). Se ha descrito que la respuesta antioxidante de SOD2 se incentiva en presencia de estrés oxidativo inducido por glutamato (Fukui & Zhu, 2010; Jia et al, 2016), lo que podría explicar su anotación en esta categoría funcional.

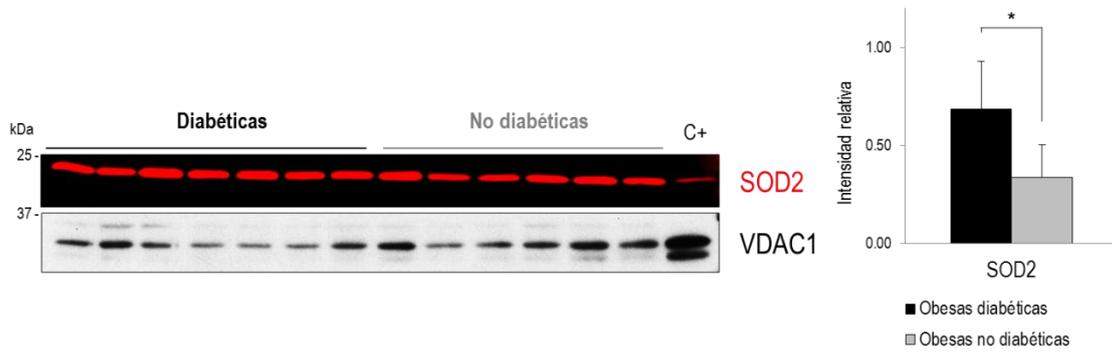


Figura 38 | Validación de SOD2 en el estudio comparativo de DM2. Un conjunto independiente de muestras de mitocondrias procedentes de obesas diabéticas (n=7, media 47 años) y no diabéticas (n=7, media 49 años) se analizó mediante WB. Las imágenes muestran un experimento representativo. Los gráficos de barras muestran los valores de intensidad relativa como medias \pm DE obtenidos después de la densitometría de las bandas. Los resultados se normalizaron con los datos obtenidos para VDAC1 (canal de intercambio aniónico dependiente de voltaje 1). La significación estadística se estableció en $p < 0,05$. **kDa**, peso molecular de las distintas bandas; **C+**, control positivo (extracto purificado de mitocondria de corazón bovina); *, $p < 0,05$.

Por otro lado, SOD2 ejerce su acción afectando a varios factores transcripcionales que son sensibles a cambios oxidativos y que están implicados en vías moleculares dentro y fuera de las mitocondrias (Wang y Hai, 2015). Llegados a este punto, nos planteamos si la alteración de SOD2 en DM2 podría estar unida a alteraciones en la comunicación de la mitocondria con el resto de la célula ya que la disminución de la *cascada de señalización intracelular* era otra de las respuestas coordinadas asociadas a la DM2 (**Figura 37, Tabla 15**). Para contrastar estas conjeturas, decidimos hacer un análisis de redes moleculares con el objetivo de conocer cuáles de estas cascadas podrían estar alterándose. Utilizando la herramienta STRING, creamos las redes de interacción (con validación experimental bajo una confianza del 0,95) de los conjuntos de proteínas implicadas en la *respuesta a los niveles de oxígeno* (**Figura 39A**) y la *cascada de señalización intracelular* (**Figura 39B**). El análisis de enriquecimiento de redes mostró que los cambios del proteoma mitocondrial en DM2 estaban estrechamente conectados con la *oxidación fosforilativa* y otras vías moleculares como la *apoptosis*, la *señalización de insulina* o la *señalización de p53* (**Tablas S20, S21**). La apoptosis es un proceso crucial regulado por la mitocondria y ha estado estrechamente asociado a la disfunción del tejido adiposo en individuos obesos (Keuper et al, 2011). Igualmente, defectos en el eje de señalización insulina/IGF-1/mTOR y la señalización de p53 se han asociado a un desequilibrio entre la mitofagia y la biogénesis mitocondrial (Gonzalez-Freire et al, 2015), remarcando la disfunción de estos procesos en DM2. Estos datos apoyan nuestra hipótesis previa en la que sugerimos que el remodelamiento mitocondrial en el tejido adiposo de pacientes diabéticos podría reflejar defectos en el número/masa de mitocondrias (Gomez-Serrano et al, 2016).

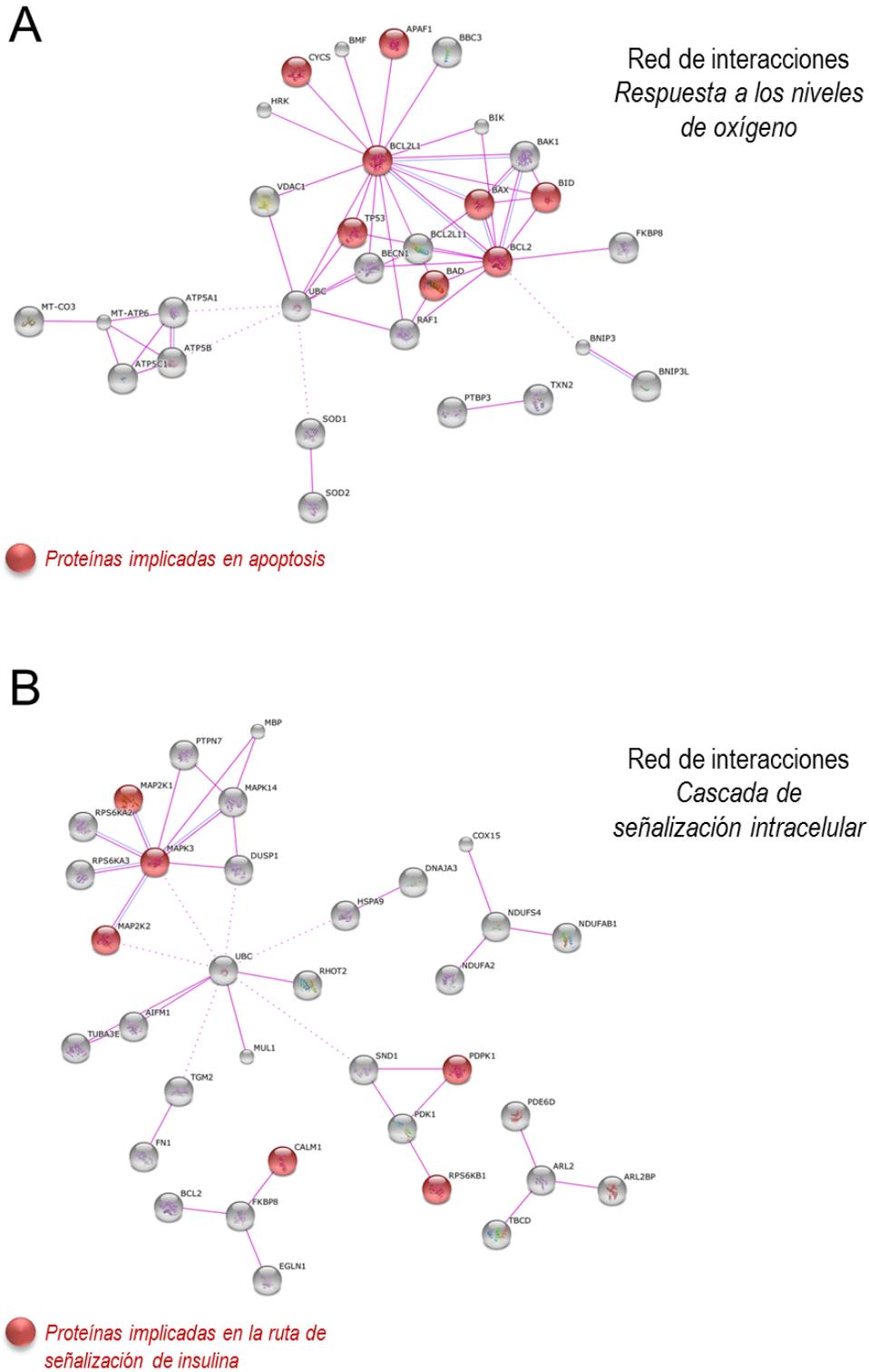


Figura 39 | Análisis de la red de interacciones de las proteínas mitocondriales reguladas en el estudio diferencial de DM2. El análisis se llevó a cabo mediante STRING (Szklarczyk et al, 2015). **(A)** Interactoma de las proteínas pertenecientes a la *Respuesta a los niveles de oxígeno* (n=11). **(B)** Interactoma de las proteínas pertenecientes a la *Cascada de señalización intracelular* (n=14). Únicamente se muestran aquellas interacciones proteína-proteína validadas experimentalmente bajo un umbral de confianza de 0,95. Los nodos rojos indican aquellas proteínas implicadas en rutas moleculares citadas en el texto.

En conjunto, los análisis de Biología de Sistemas indicaron que, pese a mostrar algunas convergencias, las alteraciones del proteoma mitocondrial en edad y DM2 siguen patrones bien diferenciados, apoyando nuestro estudio basado en el análisis de VAT (Gomez-Serrano et al, 2016). Mientras que los cambios asociados al envejecimiento muestran una localización marcadamente mitocondrial circunscrita a OXPHOS, los cambios asociados a la DM2 se extienden a otras rutas moleculares con acción tanto dentro como fuera de la mitocondria.

2.4. Regulación de los complejos mitocondriales

El ATP mitocondrial se produce a partir de la maquinaria OXPHOS mediante dos reacciones acopladas. En primer lugar, los equivalentes reductores (NADH y FADH₂) transfieren sus electrones a una serie de proteínas y moléculas orgánicas que se encuentran embebidas en la membrana mitocondrial interna (la ETC) hasta reducir el oxígeno molecular a agua. En segundo lugar, y gracias a la fuerza protón-motriz generada previamente, tiene lugar la fosforilación de ADP a ATP a través del complejo ATP sintasa. La mayoría de las subunidades OXPHOS se organizan en complejos supramoleculares (enumerados del I al IV en la ETC) y todos ellos tienen un origen genético dual (nuclear y mitocondrial), con la excepción de las subunidades del complejo II que están exclusivamente codificadas por el genoma nuclear. Nuestro estudio identificó con éxito la mayoría de los componentes de los complejos mitocondriales: 49 factores estructurales y de ensamblaje para la NADH/ubiquinona deshidrogenasa (complejo I); 3 para la succinato deshidrogenasa/ubiquinona oxidoreductasa (complejo II); 11 para la ubiquinol-citocromo c reductasa (complejo III); 23 para la citocromo c oxidasa (complejo IV) y 20 subunidades y proteínas relacionadas con la ATP sintasa (en ocasiones también denominada complejo V) (**Tabla S15**). Este trabajo es el que mayor número de proteínas OXPHOS ha identificado en células de tejido adiposo humano hasta la fecha, por ello, decidimos estudiar los cambios coordinados en cada uno de los complejos mitocondriales con mayor detenimiento.

2.4.1. Alteración de los complejos mitocondriales con el envejecimiento

Anteriormente indicamos que la disminución de la *fosforilación oxidativa* con la edad fue uno de los cambios proteicos coordinados encontrados por los análisis de Biología de Sistemas (**Figura 35, Tabla 14**). La evaluación de los complejos por separado demostró que esta disminución era patente en los complejos I, II, III y IV pero no en el complejo ATP sintasa (**Figura 40**). Debido a que los complejos I y IV son dos de los complejos más estudiados y, además, son aquellos con mayor número de proteínas identificadas, decidimos analizar los cambios en la abundancia de sus proteínas con mayor detalle. El complejo I es el complejo enzimático más grande de la cadena respiratoria: abarca 45 subunidades diferentes y requiere al menos 13 factores de ensamblaje específicos. Su actividad facilita la entrada principal de equivalentes reductores a través del NADH en la maquinaria oxidativa (Mimaki et al, 2012; Stroud et al, 2016).

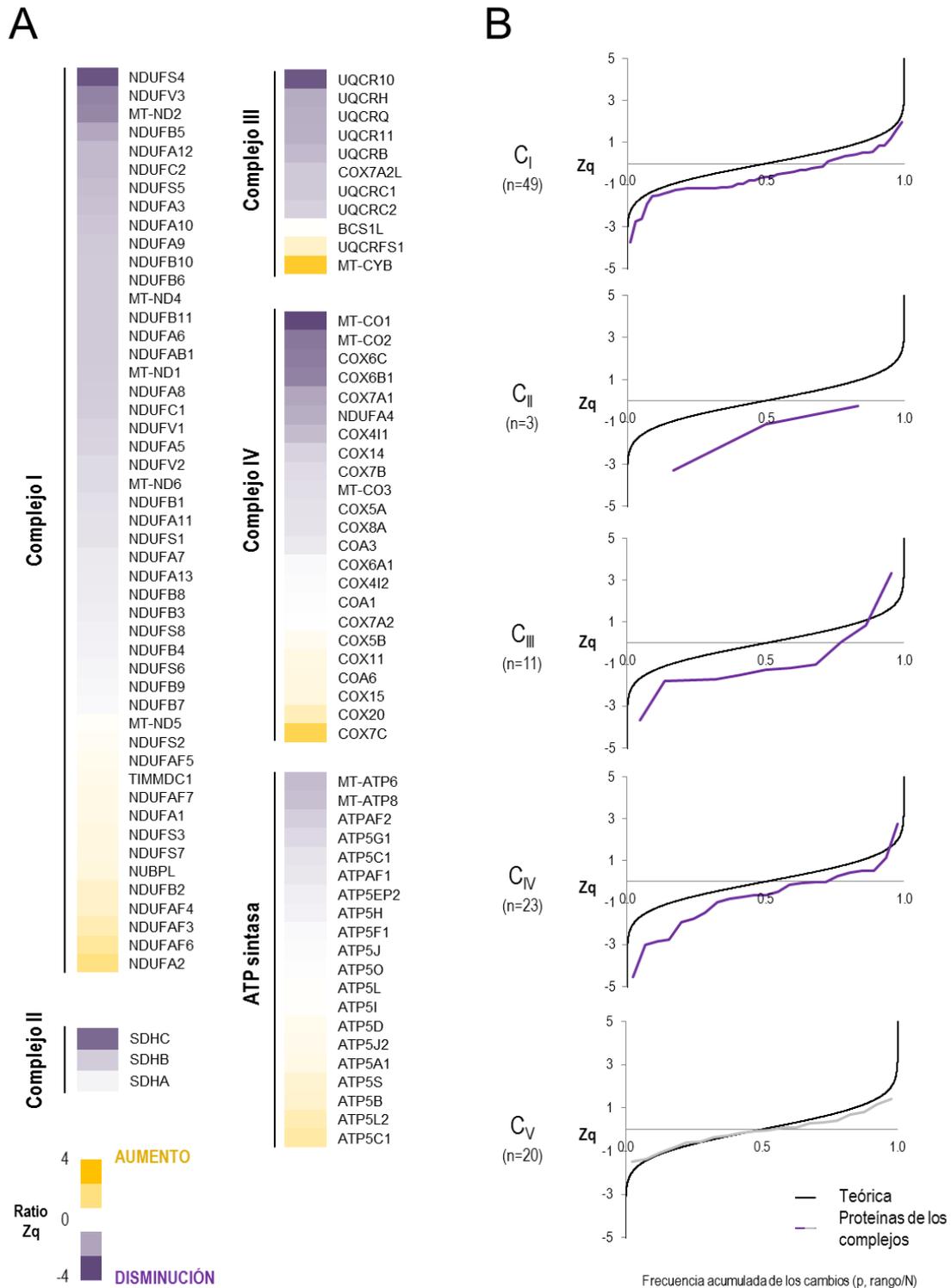


Figura 40 | Regulación de los complejos mitocondriales con el envejecimiento. (A) Heat-maps que representan los cambios en la abundancia de las proteínas OXPHOS para cada uno de los complejos. Cada proteína se muestra con su valor Zq en una escala de color amarillo-morado que representa mayor o menor abundancia en obesas mayores de 45 años vs. menores de 35 años, respectivamente. **(B)** Modulación de los complejos mitocondriales. El gráfico muestra la frecuencia acumulada de los cambios (valor Zq) para cada conjunto de proteínas y la distribución de la curva teórica normal (en negro) como referencia. El desplazamiento respecto a la curva teórica hacia arriba o

hacia abajo indica un aumento o disminución global de las proteínas que pertenecen a cada complejo. El color de la curva refleja el comportamiento global del complejo. **C_I**, complejo I o NADH deshidrogenasa; **C_{II}**, complejo II o succinato deshidrogenasa; **C_{III}**, complejo III o citocromo c reductasa; **C_{IV}**, complejo IV o citocromo c oxidasa; **C_V**, complejo V o ATP sintasa. Figura modificada de (Gomez-Serrano et al, 2017).

El complejo I posee una estructura en forma de L compuesta por un brazo embebido en la membrana mitocondrial interna que constituye el módulo P, o bomba de protones, y un brazo periférico orientado hacia la matriz mitocondrial que cuenta con dos bloques funcionales, el módulo N, encargado de la unión y oxidación del NADH, y el módulo Q, encargado de la transferencia de electrones a la ubiquinona (Zickermann et al, 2015). El complejo IV es la oxidasa terminal de la ETC donde los electrones son transportados a través de 4 centros redox activos hasta el oxígeno molecular (Srinivasan & Avadhani, 2012). Este complejo posee una estructura homo o heterodimérica. Para formar cada monómero se ensamblan 3 proteínas codificadas por el ADNmt (MT-CO1, MT-CO2 y MT-CO3), que dan lugar a la estructura central o *core*, junto con el resto de componentes codificados por el genoma nuclear que se disponen en la periferia (Mick et al, 2011).

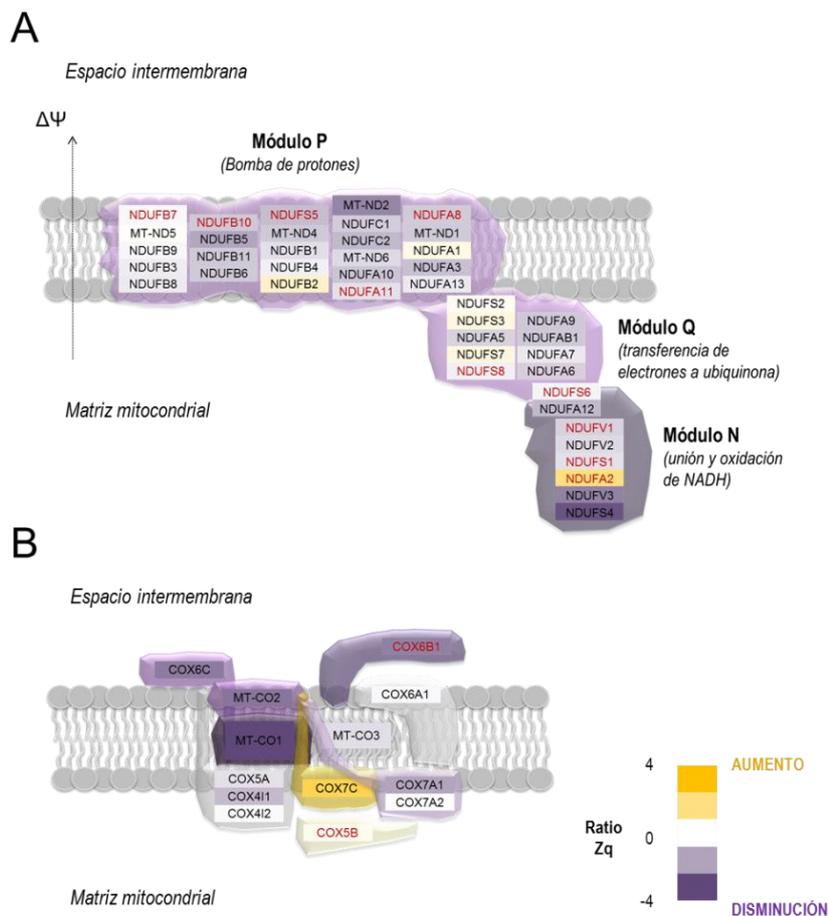


Figura 41 | Análisis de los complejos I y IV en el estudio diferencial de edad. Representación estructural de los cambios en la abundancia de las proteínas del complejo I (**A**) y de un monómero del complejo IV (**B**). Los factores de ensamblaje no se representan. El color de las cajitas representa la abundancia relativa de cada proteína y el

color de la estructura tridimensional enfatiza el comportamiento global de cada módulo: amarillo indica mayor abundancia y morado menor abundancia, en obesas mayores de 45 años vs. menores de 35 años. Las proteínas de las que se identificaron residuos oxidados de Cys (oxCys) se encuentran señaladas en rojo. Figura tomada de (Gomez-Serrano et al, 2017).

La representación esquemática de los cambios en la abundancia de las proteínas a lo largo de las estructuras de los complejos I y IV (de acuerdo a las descripciones más actualizadas (Mick et al, 2011; Mimaki et al, 2012; Sanchez-Caballero et al, 2016; Stroud et al, 2016)), evidenció que la mayoría de estas proteínas disminuyen con la edad (**Figura 41**). Esta disminución fue más acusada en el módulo N del complejo I (**Figura 41A**), así como en dos de las proteínas del *core* (MT-CO1 y MT-CO2) y dos proteínas periféricas (COX6B1y COX6C) del complejo IV (**Figura 41B**). Debido a que las alteraciones en las proteínas señaladas podrían contribuir no solo a la inestabilidad de la estructura de ambos complejos sino también a la disminución de su actividad, nuestros datos nos permiten aventurar un deterioro del flujo de electrones en la ETC mitocondrial de los adipocitos con el envejecimiento.

Por otro lado, nuestros resultados mostraron una marcada disminución de las proteínas codificadas por el ADNmt con la edad (**Figura 42**).

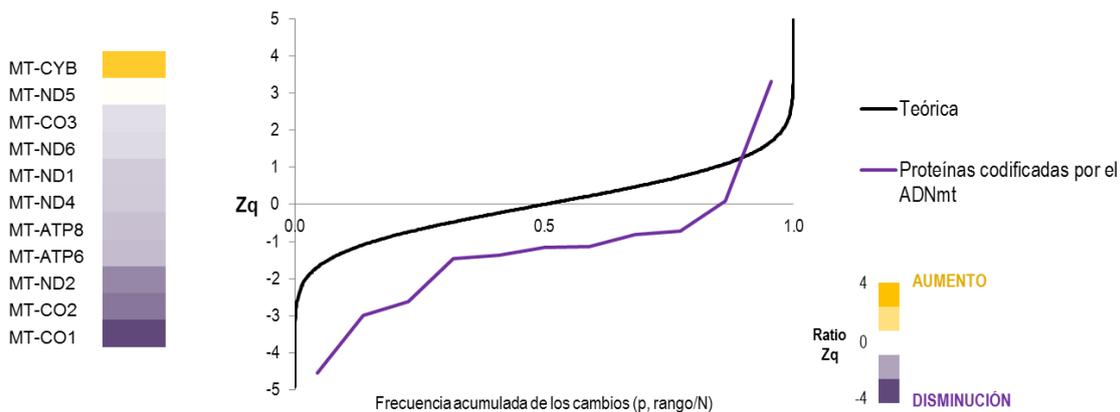


Figura 42 | Alteración de las proteínas codificadas por el ADNmt con la edad. A la izquierda se muestra un *heat-map* con los cambios en la abundancia de las proteínas codificadas por el ADNmt en una escala de color amarillo-morado que representa mayor o menor abundancia en obesas mayores de 45 años vs. menores de 35 años, respectivamente. A la derecha, se muestran la curva sigmoidea con la frecuencia acumulada de los cambios y la distribución de la curva teórica normal (en negro) como referencia. Nótese que la proteína MT-ND3 no aparece cuantificada dado que su identificación recae sobre péptidos que contienen residuos de Cys. Figura tomada de (Gomez-Serrano et al, 2017).

Un resultado interesante fue hallar el factor de transcripción mitocondrial (TFAM) disminuido significativamente en obesas mayores de 45 años vs. menores de 35 años ($Zq = -3.05$, **Tabla S17**) (**Figura 43A**). Esta proteína no solo regula el número de copias del ADNmt (Larsson et al, 1998), sino también su estabilidad, replicación y transcripción (Campbell et al, 2012). Adicionalmente se confirmó la

correlación negativa entre la abundancia de TFAM y la edad de los pacientes (**Figura 43B**), lo que podría explicar la disminución de las proteínas codificadas por el ADNmt con el envejecimiento. La disminución de TFAM con la edad se ha verificado previamente en tejidos de rata como el músculo o el hígado (Pesce et al, 2005; Picca et al, 2013). Nuestros resultados para tejido adiposo humano aportan otro tejido más en el que TFAM disminuye con la edad.

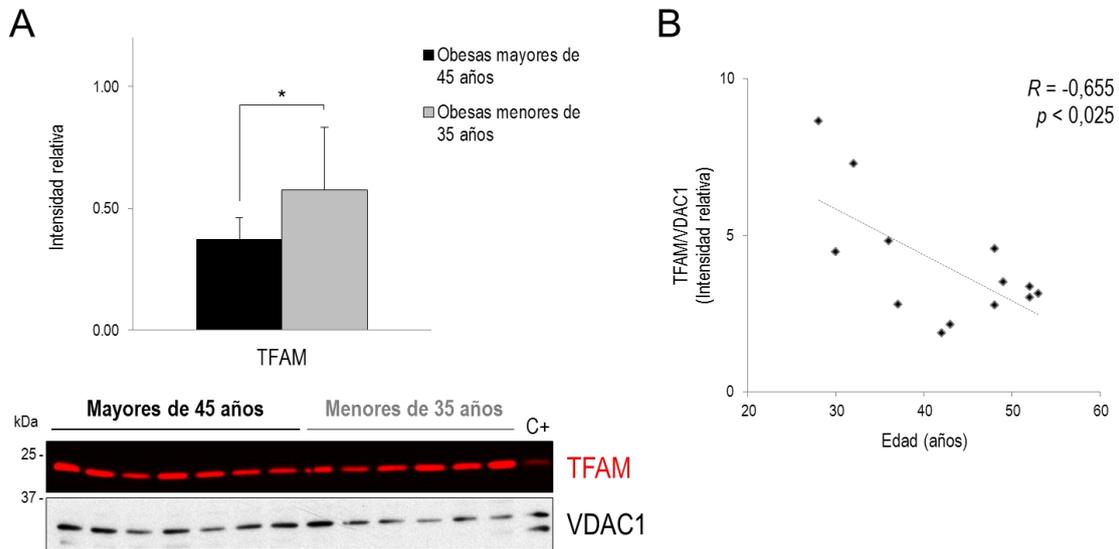


Figura 43 | Validación de TFAM en el estudio diferencial de edad. Un conjunto independiente de muestras de mitocondrias procedentes de obesas no diabéticas de mayor ($n=7$, media 49 años) y menor edad ($n=6$, media 34 años) se analizó mediante WB. **(A)** Los gráficos de barras muestran los valores de intensidad relativa como medias \pm DE obtenidos después de la densitometría de las bandas. Las imágenes muestran un experimento representativo. **(B)** Análisis de correlación (Pearson) de los valores de intensidad relativa de TFAM respecto a la edad de los pacientes. Todos los resultados se normalizaron con los datos obtenidos para VDAC1 (canal de intercambio aniónico dependiente de voltaje 1). La significación estadística se estableció en $p < 0,05$. **kDa**, peso molecular de las distintas bandas; **C+**, control positivo (extracto purificado de mitocondria de corazón bovina); *, $p < 0,05$.

Es importante enfatizar que en el primer análisis proteómico descrito en esta Tesis Doctoral se puso de manifiesto una disminución de las proteínas mitocondriales codificadas por el genoma nuclear que se acompañaba a su vez de una disminución de proteínas relacionadas con la transcripción y la traducción en el VAT (Gomez-Serrano et al, 2016). Estos datos unidos a los encontrados para TFAM a nivel de la mitocondria, ponen de manifiesto la existencia de defectos en la expresión de proteínas de la ETC codificadas tanto por el genoma mitocondrial como el nuclear en el tejido adiposo con el envejecimiento.

2.4.2. Alteración de los complejos mitocondriales en relación a la DM2

Para nuestro asombro, el análisis de Biología de Sistemas no destacó la alteración coordinada del sistema OXPHOS al comparar pacientes diabéticos frente a no diabéticos, un resultado que cabría

esperar dados los antecedentes encontrados en el análisis del VAT (Gomez-Serrano et al, 2016). Con el objetivo de confirmar estos datos, decidimos realizar un estudio detallado de los complejos mitocondriales individualmente. Dicho estudio reveló que los cambios en el complejo I seguían una distribución normal, mientras que los complejos III, IV y V se mostraban ligeramente disminuidos (**Figura 44**).

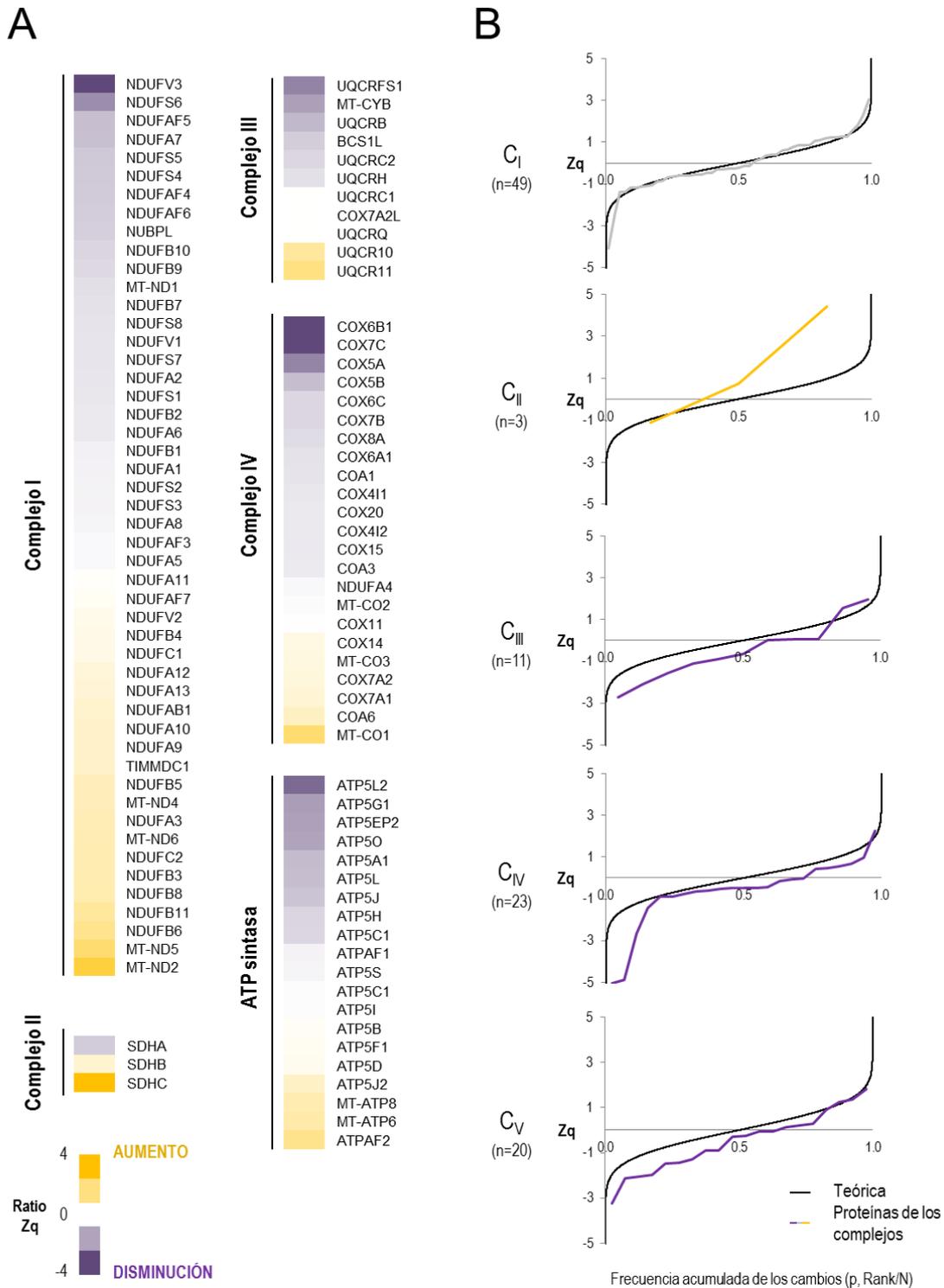


Figura 44 | Regulación de los complejos mitocondriales con la DM2. (A) Heat-maps que representan los cambios en la abundancia de las proteínas OXPHOS para cada uno de los complejos. Cada proteína se muestra

con su correspondiente valor Zq en una escala de color amarillo-morado que representa mayor o menor abundancia en obesas diabéticas vs. no diabéticas, respectivamente. **(B)** Modulación de los complejos mitocondriales. El gráfico muestra la frecuencia acumulada de los cambios (valor Zq) para cada conjunto de proteínas y la distribución de la curva teórica normal (en negro) como referencia. El desplazamiento respecto a la curva teórica hacia arriba o hacia abajo indica un aumento o disminución global de las proteínas que pertenecen a cada complejo. El color de la curva refleja el comportamiento global del complejo. **C_I**, complejo I o NADH deshidrogenasa; **C_{II}**, complejo II o succinato deshidrogenasa; **C_{III}**, complejo III o citocromo c reductasa; **C_{IV}**, complejo IV o citocromo c oxidasa; **C_V**, complejo V o ATP sintasa. Figura modificada de (Gomez-Serrano et al, 2017).

Este patrón se validó por WB mediante el análisis de varios marcadores OXPHOS en un conjunto de muestras diferentes a las utilizadas en el estudio proteómico **(Figura 45)**. En consonancia a nuestros resultados, un estudio anterior también había descrito una disminución de los complejos III, IV y V asociada a obesidad e IR, aunque en este caso fue en SAT (Heinonen et al, 2015).

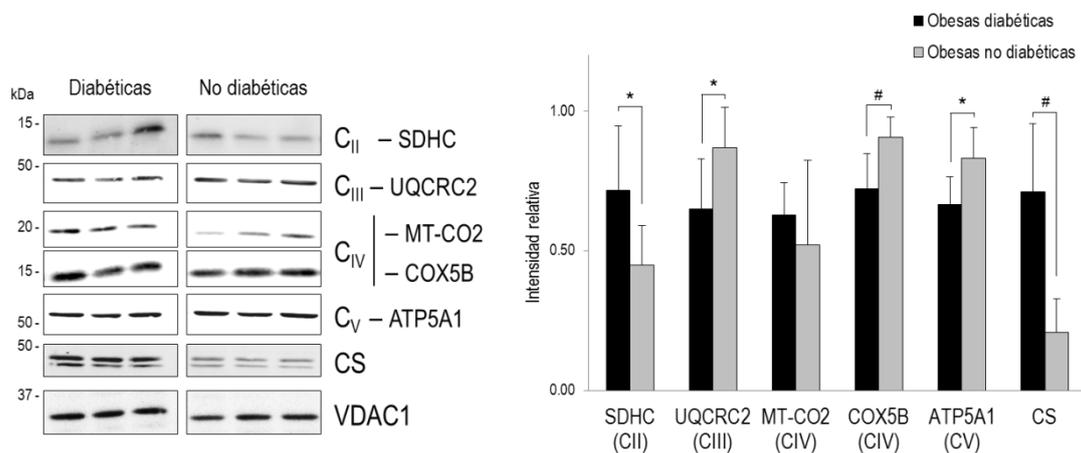


Figura 45 | Análisis de marcadores OXPHOS y CS en el estudio de DM2. Imágenes representativas de marcadores seleccionados que se analizaron mediante WB en un conjunto independiente de muestras de mitocondrias procedentes de pacientes diabéticas (n=7, media 47 años) y no diabéticas (n=7, media 49 años). Los gráficos de barras muestran los valores de intensidad relativa como medias \pm DE obtenidos después de la densitometría de las bandas. Los resultados se normalizaron con los datos obtenidos para VDAC1 (canal de intercambio aniónico dependiente de voltaje 1). La significación estadística se estableció en $p < 0,05$. **kDa**, peso molecular de las distintas bandas; *, $p < 0,05$; #, $p < 0,01$. Figura modificada de (Gomez-Serrano et al, 2017).

El hecho de que el complejo I no se encontrara alterado explicaba por qué los análisis de Biología de Sistemas no detectaron cambios en OXPHOS. Esto se debe a que este complejo tiene un gran peso estadístico por el alto número de proteínas que lo integran, y por tanto, la respuesta coordinada que se detecta para el sistema OXPHOS se corresponde en gran medida al comportamiento del complejo I. Esta importancia “estadística” unida a su importancia biológica como principal punto de entrada de

equivalentes reductores a la ETC, nos llevó a estudiar los cambios sufridos por las proteínas que lo conforman (**Figura 46A**). Curiosamente, identificamos un patrón de cambios distinto dependiendo de los módulos del complejo implicados: mientras que el módulo P aumentaba de forma global en mujeres diabéticas frente a no diabéticas, los módulos Q y N estaban disminuidos.

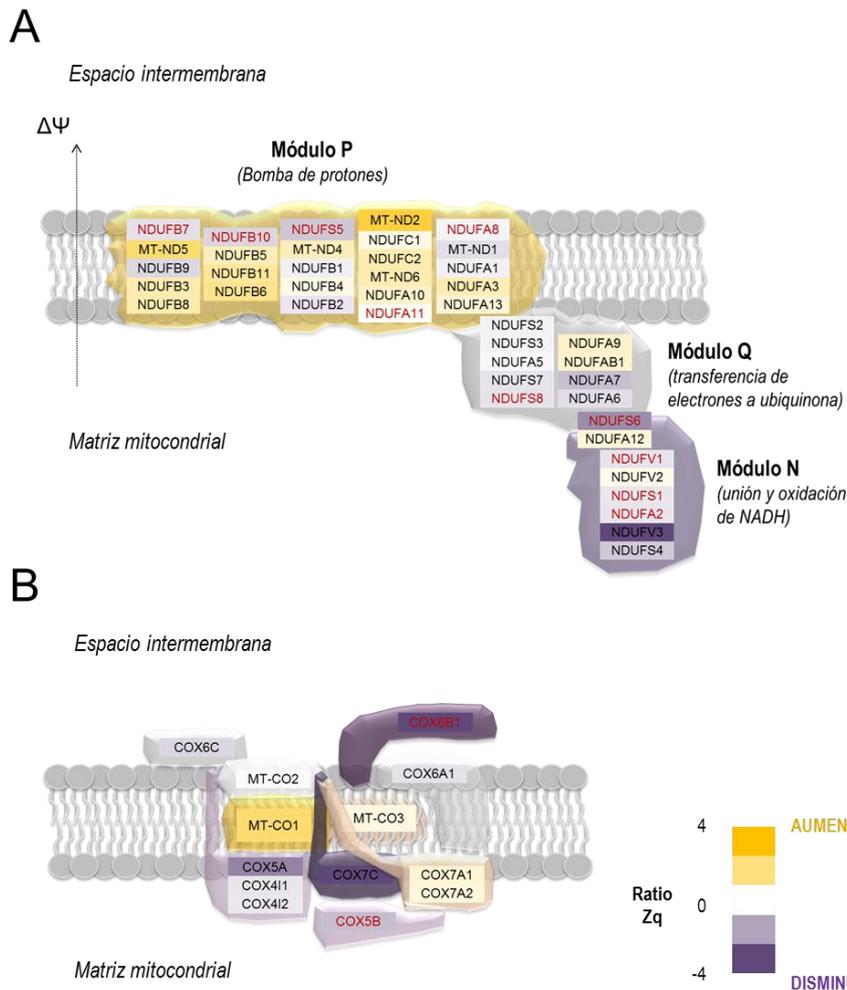


Figura 46 | Análisis de los complejos I y IV en el estudio diferencial de DM2. Representación estructural de los cambios en la abundancia de las proteínas del complejo I (**A**) y de un monómero del complejo IV (**B**). Los factores de ensamblaje no se representan. El color de las cajitas representa la abundancia relativa de cada proteína y el color de la estructura tridimensional enfatiza el comportamiento global de cada módulo: amarillo indica mayor abundancia y morado menor abundancia, en obesas diabéticas vs. no diabéticas. Las proteínas de las que se identificaron residuos oxidados de Cys (oxCys) se encuentran señaladas en rojo. Figura tomada de (Gomez-Serrano et al, 2017).

Paralelamente a estos cambios, también se detectó un aumento pronunciado de la proteína succinato deshidrogenasa citocromo b560 (SDHC), la subunidad de anclaje del complejo II a la membrana (**Figuras 44 y 45**). Esta proteína está encargada de transferir electrones desde el succinato a la ubiquinona y también forma parte del TCA. Es importante recordar que el complejo II es el punto de

entrada secundario de equivalentes reductores en la ETC (a partir de FADH₂). Estos resultados sugieren que el aumento del complejo II podría significar una respuesta compensatoria a la reducción de la capacidad oxidativa en pacientes diabéticos, debida a la disminución global del módulo N en el complejo I y de los complejos III, IV y V. Esta hipótesis se apoya en estudios previos con un modelo de ratón donde el aumento de la actividad del complejo II en tejido adiposo se produce cuando existe deficiencia de la actividad de los complejos I, III y IV (Vernochet et al, 2012). En este mismo trabajo, los autores también describieron una mejora de la actividad CS en tejido adiposo como compensación. En línea con estas observaciones, en nuestro estudio proteómico también se detectó un aumento significativo de CS en las mitocondrias de pacientes diabéticos frente a no diabéticos ($Zq= 3.28$, **Tabla S17**), resultado que se validó paralelamente mediante WB (**Figura 45**). Este conjunto de resultados nos llevaron a proponer la siguiente hipótesis: bajo un contexto de obesidad, en el VAT de los pacientes diabéticos podría producirse un cambio metabólico que favoreciera la respiración mitocondrial a través del succinato (complejo II).

Otro resultado llamativo que obtuvimos es que las proteínas codificadas por el ADNmt se encontraron globalmente aumentadas en DM2 (**Figura 47**), en contraste con otros estudios que encontraron una correlación inversa entre el contenido del ADNmt y el desarrollo de DM2 (Hsieh et al, 2011; Lindinger et al, 2010). Sin embargo, dichos estudios se llevaron a cabo con muestras de tejido adiposo total, y por lo tanto, podrían reflejar diferencias en la masa mitocondrial de los pacientes.

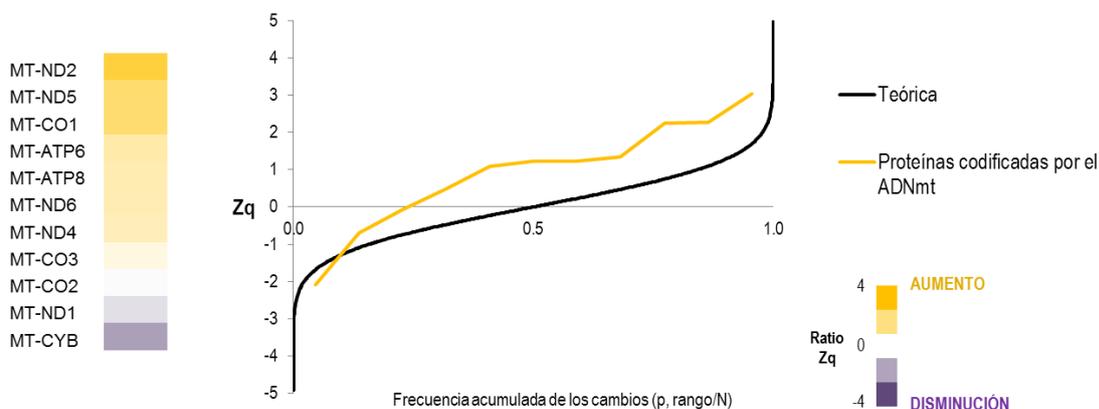


Figura 47 | Alteración de las proteínas codificadas por el ADNmt en relación a la DM2. A la izquierda se muestra un *heat-map* con los cambios en la abundancia de las proteínas codificadas por el ADNmt en una escala de color amarillo-morado que representa mayor o menor abundancia en obesas diabéticas vs. no diabéticas, respectivamente. A la derecha, se muestran la curva sigmoidea con la frecuencia acumulada de los cambios y la distribución de la curva teórica normal (en negro) como referencia. Nótese que la proteína MT-ND3 no aparece cuantificada dado que su identificación recae sobre péptidos que contienen residuos de Cys. Figura tomada de (Gomez-Serrano et al, 2017).

El análisis que se describe en esta Tesis Doctoral está basado en la evaluación de mitocondrias aisladas, de manera que se evitaron posibles diferencias asociadas a la disminución del contenido mitocondrial total. Nuestros resultados muestran el patrón proteómico de las mitocondrias *per se* en unos pacientes frente a otros, reflejando las posibles alteraciones metabólicas y estructurales sufridas por estos orgánulos. Los cambios observados para las proteínas codificadas por el ADNmt en el estudio de DM2 podrían deberse a una alteración de la traducción de estas (Villarroya et al, 2009) pero también podrían reflejar una acumulación anormal de ciertos módulos de los complejos mitocondriales debido a defectos en su ensamblaje, como se discutirá a continuación.

2.4.3. Hipótesis sobre los defectos en el importe de proteínas mitocondriales como causa subyacente a la disfunción mitocondrial en DM2

La hipótesis que sostiene que los defectos en el ensamblaje de los complejos podrían explicar la acumulación diferencial (y anómala) de unos módulos con respecto a otros se ve reforzada por los cambios observados en la estructura de los complejos I y IV, en los que existen claras diferencias en la abundancia de los módulos codificados mayoritariamente por el genoma nuclear vs. el mitocondrial (**Figura 46**). El módulo P del complejo I (que contiene el mayor número de proteínas de origen mitocondrial) está globalmente aumentado mientras que el módulo N (que está compuesto exclusivamente por proteínas de origen nuclear) está disminuido (**Figura 46A**). Igualmente para el complejo IV, nuestros datos revelaron diferencias entre las proteínas codificadas por el ADNmt (el *core*) y las codificadas por el genoma nuclear (periféricas) (**Figura 46B**). Cabe destacar que las proteínas del módulo P del complejo I y las que forman el *core* del complejo IV son las primeras que se juntan durante el proceso de ensamblaje de los complejos (Mick et al, 2011; Mimaki et al, 2012), lo cual refuerza nuestra premisa. Esta acumulación podría deberse, en parte, a defectos en la translocación de las subunidades codificadas por el núcleo en pacientes diabéticos, de manera que los primeros módulos ensamblados (en nuestro caso, el módulo P del complejo I o el *core* del complejo IV) quedarían “a la espera” de la llegada de las subunidades nucleares para terminar de ensamblar los complejos mitocondriales, y por tanto se acumularían en el interior de la mitocondria (ocasionando el patrón observado).

En consonancia con la hipótesis anteriormente formulada, es importante recalcar que el importe de proteínas hacia la mitocondria es un proceso muy regulado. Las proteínas codificadas por el genoma nuclear se sintetizan en el citosol y se transportan hacia la mitocondria a través de chaperonas como la proteína de choque térmico 70 (HSP70) (Chatzi et al, 2016). Una vez alcanzan la mitocondria, se transportan hacia el interior a través de complejos transportadores de la membrana mitocondrial (principalmente a través de los complejos TOM, en la membrana externa, y TIM, en la membrana interna) (Schmidt et al, 2010; Young et al, 2003). Nuestro grupo había descrito previamente una disminución de los niveles de HSP70 en pacientes diabéticos frente a no diabéticos (Perez-Perez et al, 2012a) y, en el presente estudio, diversas proteínas TOM (translocasas de la membrana externa), como TOMM70A ($Zq = -3.31$) y TOMM20 ($Zq = -2.07$) (**Tabla S17**) estaban significativamente disminuidas, lo que,

adicionalmente, apoyaría la hipótesis sobre los defectos en el importe mitocondrial en pacientes diabéticos.

2.5. Análisis del redoxoma tiólico mitocondrial

La reducción y oxidación de los residuos tioles de las proteínas se consideran unos de los mecanismos principales que las ROS utilizan para integrarse en las vías de señalización celulares (Winterbourn & Hampton, 2008). En particular, las modificaciones oxidativas que sufren las Cys en la mitocondria se han considerado muy importantes debido a que este orgánulo es el principal contribuyente a la concentración de ROS intracelular (Bak & Weerapana, 2015). Sin embargo, la función y las consecuencias que conllevan estas modificaciones sigue siendo un tema bastante desconocido, tanto en condiciones fisiológicas o de estrés oxidativo. Por estos motivos, decidimos estudiar la función de las ROS como mensajeros secundarios y/o moléculas de estrés. Para ello, simultáneamente al análisis del proteoma mitocondrial llevamos a cabo un método basado en el protocolo GELSILOX (Martinez-Acedo et al, 2012). De esta forma, además de los cambios de abundancia de las proteínas mitocondriales, pudimos estudiar las alteraciones dinámicas de los residuos de Cys oxidados (oxCys), en un proceso fisiológico como el envejecimiento y en un proceso patológico como la DM2.

Se identificaron 229 péptidos con modificaciones oxCys bajo un FDR 1%, que contenían 244 residuos Cys que afectaban a un total de 116 proteínas (**Tabla S22**). Las proteínas oxCys identificadas fueron principalmente oxido-reductasas con funciones de tipo *actividad antioxidante* o de *unión a nucleótidos*. Estas proteínas participan en procesos clave de la mitocondria como la *fosforilación oxidativa*, el *ciclo TCA* o la *β -oxidación* (**Tabla S23**). De hecho, 44 de los péptidos oxCys identificados (alrededor del 20%) pertenecían a subunidades de OXPHOS. Algunos de estos residuos se localizaban en proteínas de los complejos I y IV, tal como se indicó en color rojo en las **Figuras 41 y 46**. Cabe destacar que ninguno de los residuos oxCys se identificó en proteínas codificadas por el genoma mitocondrial. Esto podría deberse a que la localización de estas proteínas, fundamentalmente intramembrana, las hiciera menos accesible a los efectos de ROS.

2.5.1. Cuantificación de los niveles de oxidación en el proteoma mitocondrial: diferencias asociadas a la edad y a la DM2

En línea con el trabajo desarrollado a lo largo de esta Tesis Doctoral, los péptidos con $|Zp| \geq 2$ se consideraron diferencialmente abundantes, lo que se interpretó como residuos más oxidados ($Zp \geq 2$) o menos oxidados ($Zp \leq -2$) en un grupo respecto a otro (**Tabla 16, Tabla S22**). Señaladamente, un número considerable de residuos oxCys alterados pertenecían a puentes disulfuro o a dominios tipo C-X₉-C, como por ejemplo las Cys 30 y 65 de la proteína COX6B1 o la Cys 36 de la subunidad NDUFA8 del complejo I (**Tabla 16**). Los dominios C-X₉-C se encuentran principalmente en proteínas codificadas por el genoma nuclear que tienen que ser importadas a través de la vía MIA (*Mitochondrial Intermembrane space Assembly pathway*) (Chatzi et al, 2016; Stojanovski et al, 2012).

Tabla 16 | Péptidos diferencialmente oxidados en las proteínas mitocondriales de adipocitos en función de la edad y de la DM2. Se muestran las secuencias peptídicas con oxCys (**C***), así como el símbolo y el código de acceso a Uniprot de las proteínas a las que pertenecen dichos péptidos. La posición de la modificación (residuo Cys) también se indica junto con algunas observaciones (si existen) en cuanto a su funcionalidad. **Zp** es la variable estandarizada a nivel de péptido en términos de desviación estándar. **FDRp** muestra la tasa de error de cuantificación a nivel de péptido. La variable Zp se acompaña de una escala de color, donde el rojo indicaría una mayor abundancia del péptido (mayor oxidación) y el azul una menor abundancia del péptido (menor oxidación) en obesas mayores de 45 años vs. menores de 35 años en el estudio diferencial de edad, y en obesas diabéticas vs. no diabéticas en el estudio de DM2. **M#**, oxidación de metionina (+ 15,9949 Da); **C***, modificación MMTS de cisteína o residuo oxCys (+ 45.9877 Da); **K[^]**, marcaje iTRAQ 4-plex de lisina (+ 144,1021 Da). La modificación iTRAQ en el residuo N-terminal de los péptidos se indica con una minúscula. Tomada de (Gomez-Serrano et al, 2017).

Estudio diferencial de edad

Proteína	Código UniProt	Secuencia del péptido oxCys	Residuo Cys	Zp	FDRp	Observaciones
DLD	P09622	nETLGGTCLNVGC*IPSK [^]	85	10,13	0,00	Lugar redox activo (Puente disulfuro)
ECHS1	P30084	eM#QNLSFQDC*YSSK [^]	111	4,54	0,00	
SLC25A3	Q00325	fAC*FER	237	4,20	0,00	
RHOT1	Q8IXI2	aVLHPTGPLYC*PEEK [^]	175	4,20	0,00	
MGST1	P10620	k [^] VFANPEDC*VAFGK [^] GENA K [^]	50	3,85	0,00	Sitio de activación (cuando se modifica)
MGST1	P10620	vFANPEDC*VAFGK [^] GENA [^]	50	3,60	0,00	Sitio de activación (cuando se modifica)
ACADVL	P49748	vTDEC*IQIMGGMGFMK [^] EPG VER	433	3,03	0,00	
MGST1	P10620	vFANPEDC*VAFGK [^] GENA [^] K [^]	50	2,87	0,00	Sitio de activación (cuando se modifica)
VDAC2	P45880	sC*SGVEFSTSGSSNTDTGK [^] VTGTLETK [^]	48	2,64	0,01	
ACADS	P16219	gSSTANLIFEDC*R	246	2,58	0,01	
MDH2	P40926	eGVVEC*SFVK [^]	275	2,57	0,01	
DLAT	P10515	VPLGTPLC*IIVEK [^]	291	2,45	0,01	Región de unión lipoil
MDH2	P40926	dGYLGPEQLPDC*LK [^]	89	2,30	0,02	
COX6B1	P14854	gGDISVC*EWYQR	54	2,16	0,03	Dominio C-X ₉ -C (Puente disulfuro)
ACSF2	Q96CM8	iVGQC*LETTAQR	77	2,12	0,04	
SLC25A4	P12235	gADIMYTGTVDC*WR	258	2,09	0,04	Dominio Solcar 3 (transportador de solutos)
GPAM	Q9HCL2	vSVLELSSTFLPQC*NR	813	2,03	0,04	
CMC4	P56277	sVVC*SGFEK [^] EEEEENLTR	50	2,01	0,05	Dominio C-X ₉ -C (Puente disulfuro)
ACADVL	P49748	vTDEC*IQIMGGM#GFM#K [^]	433	-2,04	1,56	
SLC25A1	P53007	nTWDC*GLQILK [^]	262	-2,28	1,27	Dominio Solcar 3 (transportador de solutos)
MARC1	Q5VT66	gVPVSEAEC*TAM#GLR	79	-2,64	1,04	

(continúa de la página anterior)

Estudio diferencial de DM2

Proteína	Código UniProt	Secuencia del péptido oxCys	Residuo Cys	Zp	FDRp	Observaciones
COX6B1	P14854	vYQSLC*PTSWVTDWDEQRA EGTFPGK [^]	65	9,40	0,00	<i>Dominio C-X₉-C (Puente disulfuro)</i>
COX6B1	P14854	gGDIVSVC*EWYQR	54	7,23	0,00	<i>Dominio C-X₉-C (Puente disulfuro)</i>
COX6B1	P14854	nC*WQNYLDFHR	30	6,19	0,00	<i>Dominio C-X₉-C (Puente disulfuro)</i>
COX6B1	P14854	vYQSLC*PTSWVTDWDEQR	65	5,81	0,00	<i>Dominio C-X₉-C (Puente disulfuro)</i>
NDUFS1	P28331	mC*LVEIEK [^]	78	3,25	0,00	<i>Sitio de unión a metal (2Fe-2S)</i>
HSPD1	P10809	c*EFQDAYVLLSEK [^]	37	3,12	0,00	
GOT2	P00505	vGAFTMVC*K [^]	295	3,10	0,00	
ACSS3	Q9H6R3	gHVPLALC*VLR	602	2,72	0,01	
NDUFA8	P51970	aAAHHYGAQC*DK [^] PNK [^]	36	2,68	0,01	<i>Dominio C-X₉-C (Puente disulfuro)</i>
VDAC2	P45880	sC*SGVEFSTSGSSNTDTGK [^]	47	2,63	0,01	
MGST1	P10620	k [^] VFANPEDC*VAFGK [^]	50	2,58	0,01	<i>Sitio de activación (cuando se modifica)</i>
MGST1	P10620	vFANPEDC*VAFGK [^]	50	2,46	0,01	<i>Sitio de activación (cuando se modifica)</i>
NDUFS5	O43920	eWIEC*AHGIGYTR	43	2,33	0,02	<i>Dominio C-X₉-C (Puente disulfuro)</i>
ACADVL	P49748	vTDEC*IQIMGGM#GFM#K [^]	433	2,00	0,05	
ECHS1	P30084	eM#QNLSEFQDC*YSSK [^]	111	-2,08	0,95	
SLC25A4	P12235	gADIMYTGTVDC*WR	258	-2,14	0,90	<i>Dominio Solcar 3 (transportador de solutos)</i>
VDAC2	P45880	sC*SGVEFSTSGSSNTDTGK [^] VTGTLETK [^]	48	-2,23	0,84	
GPX1	P07203	gLVLVGFPC*NQFGHQENAK [^] NEEILNSLK [^]	78	-2,33	0,76	
MGST1	P10620	vFANPEDC*VAFGK [^] GENAK [^] K [^]	50	-2,33	0,75	<i>Sitio de activación (cuando se modifica)</i>
RHOT1	Q8IXI2	aVLHPTGPLYC*PEEK [^]	175	-2,55	0,53	<i>Dominio tipo Miro (intermembrana)</i>
ACAA2	P42765	iSREEC*DK [^] YALQSQR	179	-2,63	0,47	
ECH1	Q13011	yC*AQDAFFQVK [^]	225	-3,11	0,24	
MDH2	P40926	gC*DVVVIPAGVPR	93	-3,29	0,14	
SLC25A3	Q00325	fAC*FER	237	-3,90	0,02	
ACADVL	P49748	vTDEC*IQIMGGMGFMK [^] EPG VER	433	-3,98	0,01	
ACAA2	P42765	eAEVWLC*GGTESMSQAPYC *VR	116/128	-4,03	0,01	
MGST1	P10620	k [^] VFANPEDC*VAFGK [^] GENA K [^]	50	-4,20	0,01	<i>Sitio de activación (cuando se modifica)</i>
DLD	P09622	nETLGGTCLNVGC*IPSK [^]	85	-5,14	0,00	<i>Lugar redox activo (Puente disulfuro)</i>
MGST1	P10620	vFANPEDC*VAFGK [^] GENAK [^]	50	-5,56	0,00	<i>Sitio de activación (cuando se modifica)</i>
MDH2	P40926	gYLGPEQLPDC*LK [^]	89	-6,55	0,00	

La ruta MIA está conservada evolutivamente y se basa en la oxidación-reducción de residuos tiol de los dominios C-X₉-C de las proteínas dentro del espacio intermembrana, lo que permite que las proteínas se establezcan, se atrapen por transportadores de la membrana interna y finalmente se importen hacia el interior de la mitocondria (Chatzi et al, 2016; Stojanovski et al, 2012). Algunos ejemplos de las proteínas que utilizan esta vía de importe son NDUFA8, NDUFS5 o COX6B1 (Modjtahedi et al, 2016). NDUFA8 y NDUFS5 son importantes moléculas accesorias que toman parte en las últimas etapas del ensamblaje del complejo I (Szkłarczyk et al, 2011). COX6B1 es una proteína clave involucrada en la biogénesis (Modjtahedi et al, 2016) y la estabilización de las subunidades del complejo IV (Abdulhag et al, 2015). Es importante destacar que los resultados del análisis proteómico revelaron que las proteínas con dominios C-X₉-C mencionadas anteriormente (NDUFA8, NDUFS5 y COX6B1) estaban significativamente oxidadas en el estudio diferencial de DM2, es decir, varios péptidos oxCys estaban significativamente aumentados en obesas diabéticas vs. no diabéticas (**Tabla 16**). Del mismo modo, varios péptidos oxCys estaban significativamente incrementados en la proteína COX6B1 en el estudio diferencial de edad (**Tabla 16**). Estos resultados nos llevaron a plantear la siguiente hipótesis: la oxidación excesiva de proteínas con motivos C-X₉-C podría desembocar y/o reflejar una importación inadecuada de dichas proteínas a través de la ruta MIA, con la consiguiente alteración del ensamblaje de los complejos a los que pertenecen.

En este punto, es importante enfatizar que la proteína COX6B1 estaba significativamente más oxidadada tanto en el estudio diferencial de edad como en el de DM2 (**Tabla 16**). Este hecho junto con la relación establecida desde hace tiempo entre el envejecimiento y la progresión de la IR (Barzilai et al, 2012; Fink et al, 1983), nos lleva a proponer que la alteración de la vía MIA es uno de los nexos de unión entre la patología (es decir, la DM2) y el envejecimiento fisiológico.

A su vez, los resultados sobre la oxidación diferencial en proteínas importadas a través de la vía MIA apoyan la hipótesis formulada en apartados anteriores, en la que defectos en la translocación de proteínas a la mitocondria podría ser una de las causas subyacentes a la disfunción mitocondrial en DM2.

2.5.2. Relación entre el grado de oxidación y la abundancia de las proteínas

Aprovechando que la cobertura del proteoma mitocondrial alcanzada en este estudio había sido bastante elevada y que además habíamos definido el redoxoma tiólico de esas proteínas, decidimos investigar la asociación entre los niveles de oxidación de las Cys (medidos por los correspondientes valores de Zp) y la abundancia de las proteínas a las que estos pertenecían (evaluados por Zq). Los análisis de correlación revelaron que los cambios en la abundancia de oxCys estaban inversamente asociados con los niveles de abundancia de proteínas, tanto en el envejecimiento ($R = -0,26$, $p < 0,0001$) como en la DM2 ($R = -0,38$, $p < 0,0001$) (**Figura 48A**). Si evaluábamos únicamente las proteínas OXPHOS esta asociación se acentuaba, pero mucho más en el estudio diferencial de DM2 ($R = -0,64$, $p < 0,0001$) que en el de edad ($R = -0,35$, $p < 0,05$) (**Figura 48B**). Adicionalmente, el análisis global de los cambios en la abundancia de los péptidos oxCys en las proteínas OXPHOS mostró que la mayoría de

estas modificaciones tendían a estar incrementadas tanto en pacientes no diabéticas de mayor edad como en diabéticas, mientras que las proteínas (oxidadas) a las que pertenecían dichos péptidos tendían a estar disminuidas (**Figura 48C**). Estos datos pusieron de manifiesto que el impacto de las oxidaciones era más acusado en el contexto patológico (la DM2) que en el fisiológico (el envejecimiento).

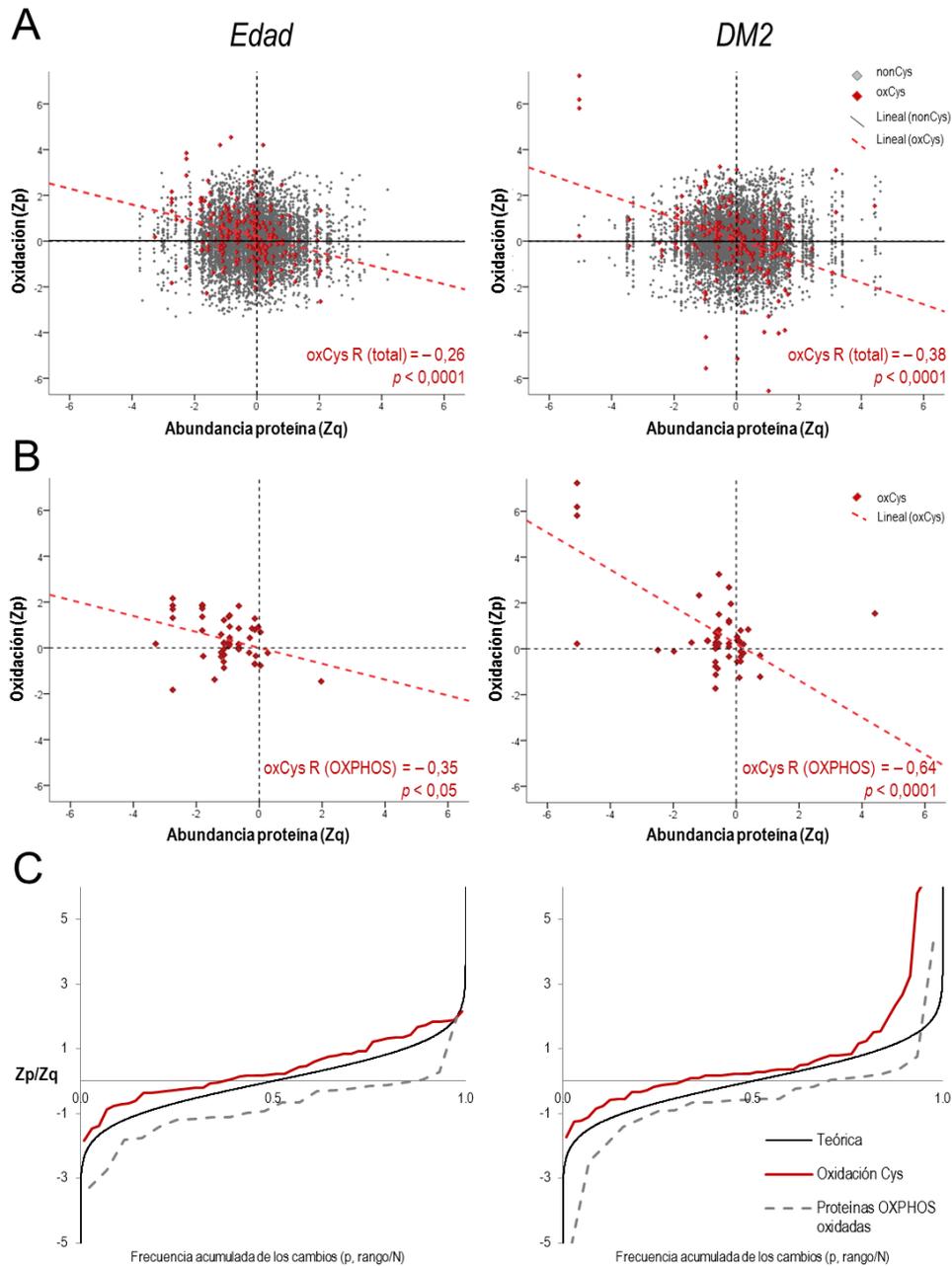


Figura 48 | Relación de la abundancia de las proteínas y sus niveles de oxidación. (A-B) Gráficos de puntos de los péptidos que no contienen residuos Cys (nonCys, puntos grises) y aquellos que contienen residuos oxidados de Cys (oxCys, puntos rojos). Cada punto representa el ratio relativo de la abundancia del péptido en cuestión (Zp, eje Y) respecto a la abundancia de la proteína a la que pertenece (Zq, eje X). La abundancia de los péptidos oxCys se evaluó para el conjunto completo de proteínas (**A**) o para las proteínas OXPHOS (**B**). La relación se evaluó

mediante el índice de correlación de Pearson (R). La significación estadística se estableció en $p < 0,05$. (C) Frecuencias acumuladas de los cambios en la abundancia de los péptidos oxCys (Zp, línea roja) y sus respectivas proteínas OXPPOS oxidadas (Zq, línea gris discontinua). Se muestra la distribución de una curva teórica normal (en negro) como referencia. El desplazamiento respecto a la curva teórica hacia arriba indica un aumento global de la oxidación y hacia abajo una disminución de la abundancia de las proteínas en el estudio diferencial de edad (a la izquierda) y de DM2 (a la derecha). Figura tomada de (Gomez-Serrano et al, 2017).

Aunque las implicaciones biológicas de la mayoría de las modificaciones oxidativas aún están por explorar, estudios recientes han señalado un papel importante de las modificaciones reversibles de Cys en la señalización redox (Go et al, 2015), así como en la regulación de la degradación de proteínas (Pajares et al, 2015). A pesar de que la relación entre la abundancia de la proteína y sus modificaciones oxidativas fueron similares en los contextos de envejecimiento y DM2, el análisis detallado de las modificaciones sobre la maquinaria OXPPOS revelaron distintos patrones de oxidación en ambas condiciones (Figura 49).

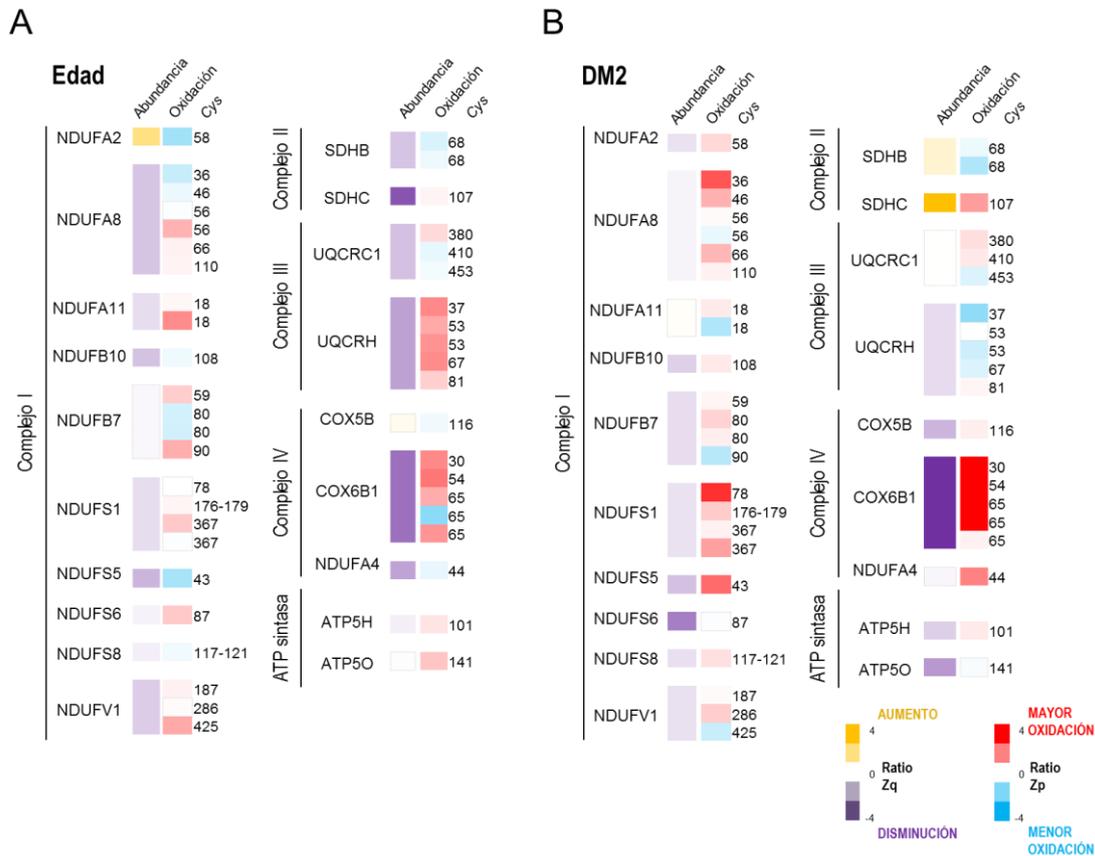


Figura 49 | Oxidación de las proteínas OXPPOS. Heat-maps que representan los cambios en la abundancia de los residuos oxCys identificados en las proteínas OXPPOS de los complejos mitocondriales en los estudios diferenciales de edad (A) y DM2 (B). La abundancia de cada proteína se muestra con el valor Zq representado con una escala de color amarillo-morado (amarillo, aumento; morado, disminución). El nivel de oxidación se representa en una escala rojo-azul para el valor Zp donde rojo indica mayor abundancia del péptido (mayor oxidación) y azul indica menor abundancia del péptido (menor oxidación). Figura tomada de (Gomez-Serrano et al, 2017).

En el estudio diferencial de edad, la oxidación ocurría principalmente en los complejos III y IV (**Figura 49A**). Estos complejos incluían las proteínas más disminuidas en pacientes de mayor edad frente a las más jóvenes. Sin embargo, en el estudio diferencial de DM2, la oxidación diferencial quedó restringida a los complejos I y IV, cuyas proteínas fueron también las más disminuidas (**Figura 49B**). En consonancia a nuestros resultados, un estudio reciente demostró que la oxidación del complejo I precede a su degradación (Guaras et al, 2016).

Es importante enfatizar que otro de los resultados relevantes del análisis de proteómica redox fue que la oxidación de los dominios C-X₉-C de COX6B1 (complejo IV) estaba aumentada en pacientes de mayor edad (en el estudio de envejecimiento) y en pacientes diabéticas (en el estudio diferencial de DM2) (**Figura 49, Tabla 16**). Estos datos podrían reflejar una importación defectuosa hacia la mitocondria a través de la vía MIA (como se describió anteriormente). Este hecho explicaría por qué los niveles de COX6B1 se encuentran significativamente reducidos en las mitocondrias de pacientes diabéticas frente a no diabéticas (Zq= -5,06, **Tabla S17**), así como en las de pacientes mayores de 45 años frente a las menores de 35 años (Zq= -2,75, **Tabla S17**).

Por tanto, los cambios oxidativos observados en las proteínas mitocondriales del VAT en las dos condiciones estudiadas podrían reflejar defectos en su plegamiento lo que podría dar lugar a una alteración de su importe hacia la mitocondria (Chatzi et al, 2016) así como favorecer su degradación (Pajares et al, 2015).

2.6. Estudio funcional de la mitocondria de adipocitos humanos: diferencias asociadas a la DM2

Las alteraciones en los patrones de abundancia y oxidación detectados nos hicieron sospechar acerca de la posible existencia de defectos en la función oxidativa de las mitocondrias, especialmente en el caso del complejo IV. Pese a que los datos apuntaban a que la disfunción de este complejo podría ser importante tanto en un contexto de envejecimiento como de DM2, la limitación de muestras biológicas procedentes de pacientes no diabéticas de menor edad nos impidió evaluar las alteraciones funcionales en las mitocondrias de dichas pacientes. Por consiguiente, no fue posible validar los resultados encontrados en el estudio diferencial de edad.

Con el objetivo de comprobar si la mayor oxidación de la proteína COX6B1 junto con la disminución de su abundancia se acompañaba también de defectos en el complejo IV, llevamos a cabo un análisis de la actividad total de dicho complejo en un conjunto independiente de extractos mitocondriales procedentes de pacientes con y sin DM2. Los resultados de este análisis mostraron que la actividad de la actividad citocromo c oxidasa se encontraba significativamente disminuida en pacientes diabéticos vs. no diabéticos (**Figura 50A**), tal como cabría esperar. Para comprobar si el defecto en la actividad del complejo IV se debía una disminución de su abundancia, como previamente había mostrado el análisis proteómico (**Figura 44**), realizamos ensayos de electroforesis en condiciones nativas (BN-PAGE) con muestras digitonizadas de mitocondrias de adipocitos. Efectivamente, los análisis de

cuantificación resultados indicaron una disminución significativa del complejo IV aislado en pacientes diabéticos (**Figura 50B**), lo que explicaría la disminución de su actividad.

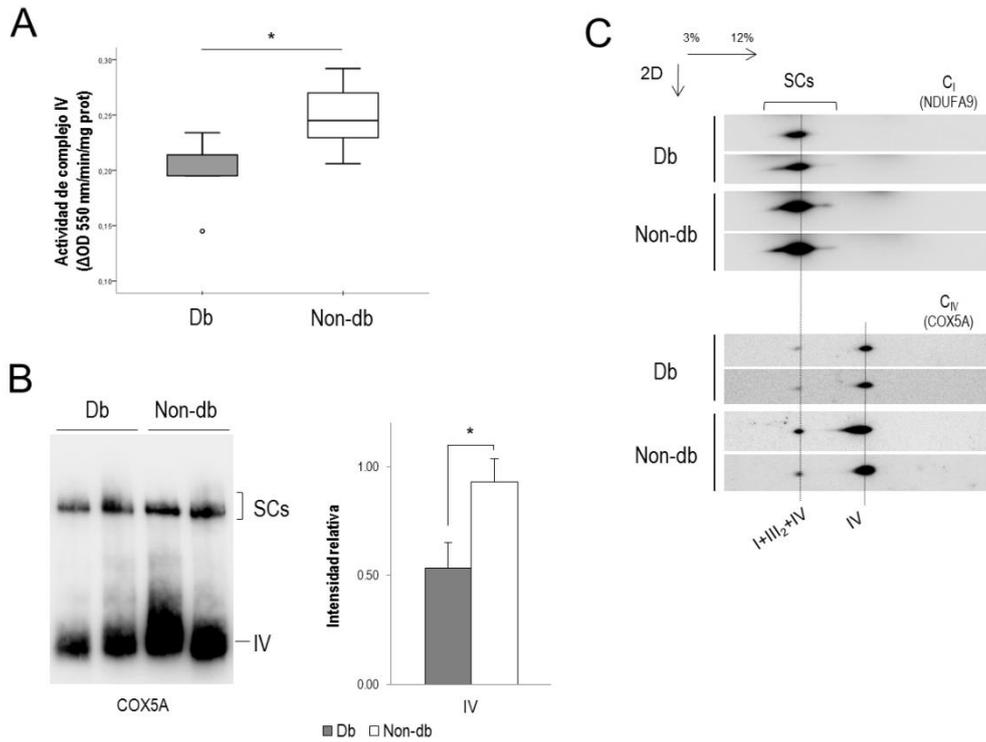


Figura 50 | Función mitocondrial de los adipocitos en relación a la DM2. (A) Actividad del complejo IV en DM2. Los resultados representan la distribución de las actividades medias obtenidas a partir de extractos de mitocondrias de adipocitos de pacientes obesos diabéticos (n=5, media 47 años) y no diabéticos (n=7, media 41 años). Todas las muestras se midieron por triplicado. **(B)** Cuantificación del complejo IV mediante 1D BN-PAGE. Las bandas se detectaron con el anticuerpo anti-COX5A en muestras de mitocondrias digitonizadas de pacientes diabéticos (n=4, media 45 años) y no diabéticos (n=3, media 50 años). El gráfico muestra los valores de intensidad relativa para cada grupo como medias \pm DE obtenidos en dos experimentos independientes. **(C)** Análisis 2D BN/SDS-PAGE representativo de muestras de pacientes obesos diabéticos (n=2) y no diabéticos (n=2). Todos los pacientes eran mayores de 40 años. Las membranas se incubaron con anticuerpos contra NDUFA9 y COX5A para revelar los supercomplejos (SCs). La significación estadística se estableció en $p < 0,05$. *, $p < 0,05$; **Db**, obesos diabéticos; **Non-db**, obesos no diabéticos. Figura tomada de (Gomez-Serrano et al, 2017).

El complejo IV se asocia a los complejos I y III, dando lugar a los supercomplejos (SCs) (Lapiente-Brun et al, 2013). Recientemente, se ha confirmado que dichos SCs son los verdaderos responsables de la respiración mitocondrial, dando lugar a lo que se conoce como “respirosoma” (Gu et al, 2016; Letts et al, 2016). Para comprobar si la alteración del complejo IV en DM2 podría también acompañarse de un defecto general en la capacidad respiratoria de las mitocondrias de los adipocitos, llevamos a cabo un análisis de cuantificación de los SCs mediante 2D BN-PAGE. Los resultados mostraron que, ciertamente, los SCs tendían a estar disminuidos en pacientes diabéticos frente a no

diabéticos (**Figura 50C**). Nuestro trabajo describe por primera vez la disminución de SCs en tejido adiposo humano en DM2 (Gomez-Serrano et al, 2017). Anteriormente, se habían descrito defectos en el ensamblaje de los SCs en mitocondrias aisladas de músculo esquelético de pacientes diabéticos (Antoun et al, 2015), lo que apoyaría nuestras conclusiones. Es necesario subrayar que la escasez de extractos mitocondriales no nos permitió analizar un mayor número de pacientes con el fin de obtener un resultado estadísticamente significativo. A este respecto, estamos recogiendo más biopsias de tejido adiposo de pacientes obesos con y sin DM2 y en breve se repetirá este análisis.

Finalmente se decidió evaluar la actividad complejo I (NADH deshidrogenasa) mediante ensayos de actividad en gel (**Figura 51**). Según el estudio proteómico diferencial de DM2 la abundancia del complejo I no aparecía globalmente alterada (**Figura 44**), pero los cambios sufridos por las proteínas en los distintos módulos del complejo I podrían provocar su inestabilidad en pacientes diabéticos (**Figura 46A**). De ser así, esto comprometería la estabilidad de los SCs, ya que estos necesitan que el complejo I esté completamente ensamblado antes de formar parte del respirosoma (Guerrero-Castillo et al, 2017). Resultados preliminares no mostraron diferencias significativas en la actividad del complejo I en relación a la DM2, si bien la actividad de las bandas de los SCs mostró una tendencia a disminuir en pacientes diabéticos (**Figura 51**). Futuros estudios en una cohorte ampliada de pacientes ayudarán a confirmar estas observaciones.

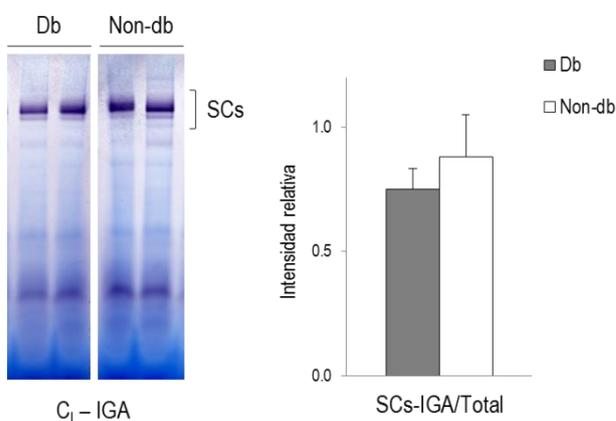


Figura 51 | Análisis de la actividad del complejo I. Los resultados muestran una imagen representativa del experimento preliminar en el que se analizó la actividad NADH deshidrogenasa en geles BN-PAGE cargados con muestras digitonizadas de mitocondrias de adipocitos de pacientes obesos diabéticos (n=4) y no diabéticos (n=4). Los resultados muestran los valores de intensidad relativa (medias \pm DE para cada grupo) de las bandas de los supercomplejos (SCs) respecto al total de señal para cada carril. **Db**, obesos diabéticos; **Non-db**, obesos no diabéticos.

Cabe destacar que la evaluación de la actividad mitocondrial en adipocitos humanos ha sido poco explorada (Fischer et al, 2015; Yin et al, 2014); y, hasta la fecha, no se habían descrito alteraciones de estos SCs en las mitocondrias de adipocitos humanos. Así pues, y pese a que el número de muestras utilizadas haya sido escaso, creemos que es relevante la novedad y el impacto de nuestros resultados, especialmente en el contexto del estudio de la obesidad.

3. REFLEXIONES FINALES

En la presente Tesis Doctoral hemos utilizado tejido adiposo de pacientes obesos para abordar dos procesos diferentes que previamente se habían relacionado con el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial: el envejecimiento (una situación fisiológica) y la DM2 (una enfermedad grave asociada a obesidad). Paralelamente, el dimorfismo sexual en el tejido adiposo también se evaluó en un contexto de DM2, poniendo de manifiesto importantes diferencias en el fenotipo antioxidante descrito en ambos sexos. El análisis global del proteoma del tejido adiposo indicó que la disfunción mitocondrial era un proceso clave en el envejecimiento y la DM2, si bien, los cambios proteicos en ambos estudios diferenciales reflejaban patrones distintos. El estudio detallado del proteoma mitocondrial utilizando mitocondrias aisladas de adipocitos demostró que las diferencias entre el envejecimiento y la DM2 se mantenían también a este nivel, aunque existían algunas convergencias. El abordaje redox utilizado simultáneamente, determinó que en las dos comparaciones los niveles de oxidación de Cys se correlacionaron negativamente con la abundancia de las proteínas, especialmente en el caso de la DM2. Entre las marcas oxidativas identificadas destacaron las de las proteínas OXPHOS, aunque su localización principal difería en ambas condiciones. En pacientes diabéticos, el patrón de disfunción mitocondrial comprendía varias características: i) aumento de la respuesta antioxidante representado por SOD2; ii) diferencias de abundancia entre los módulos de los complejos I y IV según estuviesen codificados por el genoma nuclear o el mitocondrial sugiriendo una translocación disfuncional de las proteínas hacia las mitocondrias; iii) modificaciones de oxCys relacionadas con defectos en la importación de proteínas a través de la vía minoritaria MIA; y, iv) disminución de subunidades y complejos específicos de OXPHOS acompañada de la reducción de SCs. Concretamente, en pacientes diabéticos, se ha demostrado una actividad alterada del complejo IV, el cual reúne las proteínas OXPHOS más disminuidas y, al mismo tiempo, más oxidadas. Todos estos acontecimientos, como el daño oxidativo o los cambios sufridos por el sistema OXPHOS, podrían comprometer el estado metabólico del adipocito “obeso” provocando un desequilibrio de los niveles de NADH/NAD⁺ y/o ATP/ADP así como de metabolitos intermediarios como el succinato, dando lugar a una alteración del flujo metabólico mitocondrial en los pacientes diabéticos. Además, las modificaciones de las proteínas relacionadas con el transporte hacia la mitocondria podrían afectar la comunicación intra- e inter-organular, alterando gravemente la homeostasis de los adipocitos y, por lo tanto, dando lugar a fallos en la sensibilidad a insulina.

Adicionalmente, nuestros resultados destacaron que la remodelación mitocondrial sufrida con la progresión de la edad también incluía la disminución de componentes OXPHOS junto con el aumento de los niveles de oxidación de estas proteínas, aunque en menor medida que en la DM2. No es sorprendente que las ROS y las modificaciones oxidativas desempeñen un papel más relevante en una condición patológica, como la DM2, en comparación con un proceso fisiológico, como el envejecimiento. En este sentido, el complejo IV emerge como un nexo común que conecta las modificaciones oxidativas en la DM2 y el envejecimiento, al igual que conecta el papel dual de los ROS como mensajeros

secundarios vs. moléculas de estrés. Nuestros datos avalan que la alteración del complejo IV podría representar la progresión de la IR con el paso del tiempo en individuos obesos. Es preciso destacar que la alteración del complejo IV se implicó directamente en el desarrollo de la obesidad edad-dependiente en un estudio publicado paralelamente al nuestro realizado en un modelo murino (Soro-Araiz et al, 2016), lo que apoya los resultados encontrados en esta Tesis Doctoral.

En este trabajo, hemos reducido el análisis de proteínas individuales en favor de la evaluación de los cambios globales mediante la Biología de Sistemas. La capacidad sin precedentes de estas herramientas, en combinación con los análisis de proteómica redox, ha generado una gran cantidad de información, produciendo una imagen molecular de la compleja interacción entre la disfunción mitocondrial y el envejecimiento, la obesidad y la DM2. En el futuro, el avance en la definición de la naturaleza de las modificaciones oxidativas y sus implicaciones ayudará a desarrollar modelos integradores de la regulación del proteoma y sus vías de señalización redox, proporcionando una base sólida que permita una terapia en los pacientes obesos mejor dirigida.

conclusiones .

*“A veces creo que hay vida en otros planetas, y a veces creo que no.
En cualquiera de los dos casos la conclusión es asombrosa”*

Carl Sagan (1934 - 1996)

- 1 | En este trabajo se han aplicado por primera vez técnicas proteómicas de alta resolución y herramientas de Biología de Sistemas al estudio del tejido adiposo humano en obesidad. Esto ha permitido describir, en un mismo experimento, los cambios proteicos en función del envejecimiento, la DM2 y el género.
- 2 | La aplicación de algoritmos de Biología de Sistemas ha puesto de manifiesto que la disfunción mitocondrial es un fenómeno asociado tanto al envejecimiento como a la DM2, aunque el patrón de cambios proteómicos difiere en cada caso. Con la edad, las alteraciones mitocondriales quedan circunscritas al sistema OXPHOS, mientras que con la DM2 los cambios engloban la mayoría de las funciones mitocondriales, sugiriendo una disminución del número de mitocondrias y/o de la masa mitocondrial en el VAT de los pacientes diabéticos.
- 3 | El análisis de los cambios proteicos coordinados en el estudio diferencial de género ha incluido la remodelación celular del tejido adiposo, la respuesta nutricional y la respuesta antioxidante al conjunto de diferencias fisiológicas descritas entre ambos sexos.
- 4 | Nuestros resultados sugieren que, en comparación a los hombres, la disfunción del VAT es más acusada en las mujeres diabéticas. Esto se debe a diferencias en la respuesta inmune y a una mayor hipertrofia de los adipocitos en estas pacientes.
- 5 | Este trabajo describe por primera vez la aplicación de estrategias de proteómica redox y de Biología de Sistemas al estudio del proteoma mitocondrial humano, representando el análisis más exhaustivo hasta la fecha.
- 6 | En el estudio diferencial de edad, los resultados han confirmado una disminución significativa de las proteínas OXPHOS en las mitocondrias de los adipocitos de los pacientes de mayor edad. Esta reducción se explicaría por una alteración de los procesos de transcripción y traducción tanto a nivel nuclear como mitocondrial.
- 7 | En el estudio diferencial de DM2, los módulos de los complejos codificados por el genoma nuclear y el mitocondrial presentan regulaciones opuestas. Estos datos sugieren que el importe de proteínas hacia la mitocondria podría estar afectado en pacientes diabéticos, comprometiendo el ensamblaje de los complejos.
- 8 | Tanto en envejecimiento como en DM2, los niveles de oxidación de péptidos que contienen Cys son inversamente proporcionales a la abundancia de las proteínas de las que provienen. Esta relación es más acusada en DM2, y especialmente en las subunidades de OXPHOS, lo que destaca la implicación funcional de las modificaciones oxidativas en la patología.

conclusiones.

9 | Los residuos de Cys de proteínas importadas hacia la mitocondria a través de la ruta MIA muestran un incremento del nivel de oxidación con la edad y la DM2, reflejando defectos en el transporte de estas proteínas en ambas condiciones.

10 | Estudios funcionales han revelado una disminución de la actividad del complejo IV así como defectos en el ensamblaje de los SCs con la DM2, lo que sugiere la reducción de la capacidad respiratoria mitocondrial en estos pacientes.

referencias.

“Los hechos y las fechas son el esqueleto de la historia.”

François-Marie Arouet, *Voltaire* (1694 - 1778)

- Abdulhag UN, Soiferman D, Schueler-Furman O, Miller C, Shaag A, Elpeleg O, Edvardson S, Saada A (2015) Mitochondrial complex IV deficiency, caused by mutated COX6B1, is associated with encephalomyopathy, hydrocephalus and cardiomyopathy. *Eur J Hum Genet* **23**: 159-164
- Adeva MM, Calvino J, Souto G, Donapetry C (2012) Insulin resistance and the metabolism of branched-chain amino acids in humans. *Amino Acids* **43**: 171-181
- Aguer C, Pasqua M, Thrush AB, Moffat C, McBurney M, Jardine K, Zhang R, Beauchamp B, Dent R, McPherson R, Harper ME (2013) Increased proton leak and SOD2 expression in myotubes from obese non-diabetic subjects with a family history of type 2 diabetes. *Biochimica et biophysica acta* **1832**: 1624-1633
- Ahrens CH, Brunner E, Qeli E, Basler K, Aebersold R (2010) Generating and navigating proteome maps using mass spectrometry. *Nature reviews Molecular cell biology* **11**: 789-801
- Akram M (2014) Citric acid cycle and role of its intermediates in metabolism. *Cell biochemistry and biophysics* **68**: 475-478
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Walter P, Raff M, Roberts K (2002) *Molecular Biology of the Cell 4th Edition: International Student Edition*: Routledge.
- Alfadda AA, Benabdelkamel H, Masood A, Moustafa A, Sallam R, Bassas A, Duncan M (2013) Proteomic analysis of mature adipocytes from obese patients in relation to aging. *Experimental gerontology* **48**: 1196-1203
- Altelaar AF, Munoz J, Heck AJ (2013) Next-generation proteomics: towards an integrative view of proteome dynamics. *Nature reviews Genetics* **14**: 35-48
- Amadori A, Zamarchi R, De Silvestro G, Forza G, Cavatton G, Danieli GA, Clementi M, Chieco-Bianchi L (1995) Genetic control of the CD4/CD8 T-cell ratio in humans. *Nature medicine* **1**: 1279-1283
- American Diabetes A (2014) Standards of medical care in diabetes--2014. *Diabetes Care* **37 Suppl 1**: S14-80
- Antoun G, McMurray F, Thrush AB, Patten DA, Peixoto AC, Slack RS, McPherson R, Dent R, Harper ME (2015) Impaired mitochondrial oxidative phosphorylation and supercomplex assembly in rectus abdominis muscle of diabetic obese individuals. *Diabetologia* **58**: 2861-2866
- Araya Z, Hosseinpour F, Bodin K, Wikvall K (2003) Metabolism of 25-hydroxyvitamin D3 by microsomal and mitochondrial vitamin D3 25-hydroxylases (CYP2D25 and CYP27A1): a novel reaction by CYP27A1. *Biochimica et biophysica acta* **1632**: 40-47
- Arner E, Forrest AR, Ehlund A, Mejhert N, Itoh M, Kawaji H, Lassmann T, Laurencikiene J, Ryden M, Arner P, Consortium F (2014) Ceruloplasmin is a novel adipokine which is overexpressed in adipose tissue of obese subjects and in obesity-associated cancer cells. *PLoS one* **9**: e80274
- Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill DP, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richardson JE, Ringwald M, Rubin GM, Sherlock G (2000) Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet* **25**: 25-29

- Auger C, Alhasawi A, Contavadoo M, Appanna VD (2015) Dysfunctional mitochondrial bioenergetics and the pathogenesis of hepatic disorders. *Frontiers in cell and developmental biology* **3**: 40
- Autio KJ, Kastaniotis AJ, Pospiech H, Miinalainen IJ, Schonauer MS, Dieckmann CL, Hiltunen JK (2008) An ancient genetic link between vertebrate mitochondrial fatty acid synthesis and RNA processing. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **22**: 569-578
- Bachi A, Dalle-Donne I, Scaloni A (2013) Redox proteomics: chemical principles, methodological approaches and biological/biomedical promises. *Chemical reviews* **113**: 596-698
- Bak DW, Weerapana E (2015) Cysteine-mediated redox signalling in the mitochondria. *Molecular bioSystems* **11**: 678-697
- Banerjee M, Vats P (2014) Reactive metabolites and antioxidant gene polymorphisms in Type 2 diabetes mellitus. *Redox Biol* **2**: 170-177
- Banerjee RR, Rangwala SM, Shapiro JS, Rich AS, Rhoades B, Qi Y, Wang J, Rajala MW, Poci A, Scherer PE, Stepan CM, Ahima RS, Obici S, Rossetti L, Lazar MA (2004) Regulation of fasted blood glucose by resistin. *Science* **303**: 1195-1198
- Barquissau V, Beuzelin D, Pisani DF, Beranger GE, Mairal A, Montagner A, Roussel B, Tavernier G, Marques MA, Moro C, Guillou H, Amri EZ, Langin D (2016) White-to-brite conversion in human adipocytes promotes metabolic reprogramming towards fatty acid anabolic and catabolic pathways. *Molecular metabolism* **5**: 352-365
- Barzilai N, Huffman DM, Muzumdar RH, Bartke A (2012) The critical role of metabolic pathways in aging. *Diabetes* **61**: 1315-1322
- Bekes EM, Schweighofer B, Kupriyanova TA, Zajac E, Ardi VC, Quigley JP, Deryugina EI (2011) Tumor-recruited neutrophils and neutrophil TIMP-free MMP-9 regulate coordinately the levels of tumor angiogenesis and efficiency of malignant cell intravasation. *The American journal of pathology* **179**: 1455-1470
- Belanger C, Luu-The V, Dupont P, Tchernof A (2002) Adipose tissue intracrinology: potential importance of local androgen/estrogen metabolism in the regulation of adiposity. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme* **34**: 737-745
- Berndt J, Kovacs P, Ruschke K, Kloting N, Fasshauer M, Schon MR, Korner A, Stumvoll M, Bluher M (2007) Fatty acid synthase gene expression in human adipose tissue: association with obesity and type 2 diabetes. *Diabetologia* **50**: 1472-1480
- Bjorkhem I, Hansson M (2010) Cerebrotendinous xanthomatosis: an inborn error in bile acid synthesis with defined mutations but still a challenge. *Biochemical and biophysical research communications* **396**: 46-49
- Blanchette S, Blouin K, Richard C, Dupont P, Luu-The V, Tchernof A (2005) Expression and activity of 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C1) in abdominal subcutaneous and omental adipose tissue in women. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **90**: 264-270
- Blouin K, Nadeau M, Mailloux J, Daris M, Lebel S, Luu-The V, Tchernof A (2009) Pathways of adipose tissue androgen metabolism in women: depot differences and modulation by adipogenesis. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* **296**: E244-255

- Bluher M, Michael MD, Peroni OD, Ueki K, Carter N, Kahn BB, Kahn CR (2002) Adipose tissue selective insulin receptor knockout protects against obesity and obesity-related glucose intolerance. *Developmental cell* **3**: 25-38
- Bluher M, Patti ME, Gesta S, Kahn BB, Kahn CR (2004) Intrinsic heterogeneity in adipose tissue of fat-specific insulin receptor knock-out mice is associated with differences in patterns of gene expression. *The Journal of biological chemistry* **279**: 31891-31901
- Bohr VA (2002) Repair of oxidative DNA damage in nuclear and mitochondrial DNA, and some changes with aging in mammalian cells. *Free radical biology & medicine* **32**: 804-812
- Boneva-Asiova Z, Boyanov M (2011) Age-related changes of body composition and abdominal adipose tissue assessed by bio-electrical impedance analysis and computed tomography. *Endocrinologia y nutricion : organo de la Sociedad Espanola de Endocrinologia y Nutricion* **58**: 472-477
- Bostrom P, Wu J, Jedrychowski MP, Korde A, Ye L, Lo JC, Rasbach KA, Bostrom EA, Choi JH, Long JZ, Kajimura S, Zingaretti MC, Vind BF, Tu H, Cinti S, Hojlund K, Gygi SP, Spiegelman BM (2012) A PGC1-alpha-dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature* **481**: 463-468
- Boudina S, Graham TE (2014) Mitochondrial function/dysfunction in white adipose tissue. *Experimental physiology* **99**: 1168-1178
- Brahe LK, Astrup A, Larsen LH (2016) Can We Prevent Obesity-Related Metabolic Diseases by Dietary Modulation of the Gut Microbiota? *Adv Nutr* **7**: 90-101
- Brand MD, Nicholls DG (2011) Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *The Biochemical journal* **435**: 297-312
- Bratc A, Larsson NG (2013) The role of mitochondria in aging. *The Journal of clinical investigation* **123**: 951-957
- Brigelius-Flohe R, Maiorino M (2013) Glutathione peroxidases. *Biochimica et biophysica acta* **1830**: 3289-3303
- Brosnan JT, Brosnan ME (2006) Branched-chain amino acids: enzyme and substrate regulation. *The Journal of nutrition* **136**: 207S-211S
- Brun RP, Kim JB, Hu E, Altiock S, Spiegelman BM (1996) Adipocyte differentiation: a transcriptional regulatory cascade. *Curr Opin Cell Biol* **8**: 826-832
- Buechler C, Krautbauer S, Eisinger K (2015) Adipose tissue fibrosis. *World journal of diabetes* **6**: 548-553
- Burkart AM, Tan K, Warren L, Iovino S, Hughes KJ, Kahn CR, Patti ME (2016) Insulin Resistance in Human iPS Cells Reduces Mitochondrial Size and Function. *Sci Rep* **6**: 22788
- Butterfield DA, Palmieri EM, Castegna A (2016) Clinical implications from proteomic studies in neurodegenerative diseases: lessons from mitochondrial proteins. *Expert review of proteomics* **13**: 259-274
- Cagin U, Enriquez JA (2015) The complex crosstalk between mitochondria and the nucleus: What goes in between? *The international journal of biochemistry & cell biology* **63**: 10-15

- Calvo SE, Clauser KR, Mootha VK (2016) MitoCarta2.0: an updated inventory of mammalian mitochondrial proteins. *Nucleic acids research* **44**: D1251-1257
- Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ (2003) Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *The New England journal of medicine* **348**: 1625-1638
- Calle EE, Thun MJ (2004) Obesity and cancer. *Oncogene* **23**: 6365-6378
- Camhi SM, Bray GA, Bouchard C, Greenway FL, Johnson WD, Newton RL, Ravussin E, Ryan DH, Smith SR, Katzmarzyk PT (2011) The relationship of waist circumference and BMI to visceral, subcutaneous, and total body fat: sex and race differences. *Obesity (Silver Spring)* **19**: 402-408
- Campbell CT, Kolesar JE, Kaufman BA (2012) Mitochondrial transcription factor A regulates mitochondrial transcription initiation, DNA packaging, and genome copy number. *Biochimica et biophysica acta* **1819**: 921-929
- Cao Y (2007) Angiogenesis modulates adipogenesis and obesity. *The Journal of clinical investigation* **117**: 2362-2368
- Catalan V, Gomez-Ambrosi J, Rodriguez A, Ramirez B, Rotellar F, Valenti V, Silva C, Gil MJ, Fernandez-Real JM, Salvador J, Fruhbeck G (2011) Increased levels of calprotectin in obesity are related to macrophage content: impact on inflammation and effect of weight loss. *Molecular medicine* **17**: 1157-1167
- Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, Faloia E, Wang S, Fortier M, Greenberg AS, Obin MS (2005) Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *Journal of lipid research* **46**: 2347-2355
- Ckless K (2014) Redox proteomics: from bench to bedside. *Adv Exp Med Biol* **806**: 301-317
- Coletta DK, Mandarino LJ (2011) Mitochondrial dysfunction and insulin resistance from the outside in: extracellular matrix, the cytoskeleton, and mitochondria. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* **301**: E749-755
- Corton M, Botella-Carretero JI, Lopez JA, Camafeita E, San Millan JL, Escobar-Morreale HF, Peral B (2008) Proteomic analysis of human omental adipose tissue in the polycystic ovary syndrome using two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry. *Hum Reprod* **23**: 651-661
- Corton M, Villuendas G, Botella JI, San Millan JL, Escobar-Morreale HF, Peral B (2004) Improved resolution of the human adipose tissue proteome at alkaline and wide range pH by the addition of hydroxyethyl disulfide. *Proteomics* **4**: 438-441
- Cotillard A, Poitou C, Torcivia A, Bouillot JL, Dietrich A, Kloting N, Gregoire C, Lolmede K, Bluher M, Clement K (2014) Adipocyte size threshold matters: link with risk of type 2 diabetes and improved insulin resistance after gastric bypass. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **99**: E1466-1470
- Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, Kuo FC, Palmer EL, Tseng YH, Doria A, Kolodny GM, Kahn CR (2009) Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *The New England journal of medicine* **360**: 1509-1517

- Chatzi A, Manganas P, Tokatlidis K (2016) Oxidative folding in the mitochondrial intermembrane space: A regulated process important for cell physiology and disease. *Biochimica et biophysica acta* **1863**: 1298-1306
- Chen H, Chan DC (2009) Mitochondrial dynamics--fusion, fission, movement, and mitophagy--in neurodegenerative diseases. *Human molecular genetics* **18**: R169-176
- Cheng Z, Ristow M (2013) Mitochondria and metabolic homeostasis. *Antioxidants & redox signaling* **19**: 240-242
- Cherian S, Lopaschuk GD, Carvalho E (2012) Cellular cross-talk between epicardial adipose tissue and myocardium in relation to the pathogenesis of cardiovascular disease. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* **303**: E937-949
- Chevet E, Cameron PH, Pelletier MF, Thomas DY, Bergeron JJ (2001) The endoplasmic reticulum: integration of protein folding, quality control, signaling and degradation. *Curr Opin Struct Biol* **11**: 120-124
- Chiu CJ, Wray LA (2011) Gender differences in functional limitations in adults living with type 2 diabetes: biobehavioral and psychosocial mediators. *Annals of behavioral medicine : a publication of the Society of Behavioral Medicine* **41**: 71-82
- Chiu KC, Chu A, Go VL, Saad MF (2004) Hypovitaminosis D is associated with insulin resistance and beta cell dysfunction. *Am J Clin Nutr* **79**: 820-825
- Choi MS, Jung JY, Kim HJ, Ham MR, Lee TR, Shin DW (2016) S-nitrosylation of fatty acid synthase regulates its activity through dimerization. *Journal of lipid research* **57**: 607-615
- Choo HJ, Kim JH, Kwon OB, Lee CS, Mun JY, Han SS, Yoon YS, Yoon G, Choi KM, Ko YG (2006) Mitochondria are impaired in the adipocytes of type 2 diabetic mice. *Diabetologia* **49**: 784-791
- Choudhary C, Kumar C, Gnad F, Nielsen ML, Rehman M, Walther TC, Olsen JV, Mann M (2009) Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science* **325**: 834-840
- Christiaens V, Lijnen HR (2006) Role of the fibrinolytic and matrix metalloproteinase systems in development of adipose tissue. *Arch Physiol Biochem* **112**: 254-259
- Dai Z, Yin J, He H, Li W, Hou C, Qian X, Mao N, Pan L (2010) Mitochondrial comparative proteomics of human ovarian cancer cells and their platinum-resistant sublines. *Proteomics* **10**: 3789-3799
- Dandona P, Aljada A, Bandyopadhyay A (2004) Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends Immunol* **25**: 4-7
- Daum B, Walter A, Horst A, Osiewacz HD, Kuhlbrandt W (2013) Age-dependent dissociation of ATP synthase dimers and loss of inner-membrane cristae in mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**: 15301-15306
- De Pauw A, Tejerina S, Raes M, Keijer J, Arnould T (2009) Mitochondrial (dys)function in adipocyte (de)differentiation and systemic metabolic alterations. *The American journal of pathology* **175**: 927-939
- Demerath EW, Sun SS, Rogers N, Lee M, Reed D, Choh AC, Couch W, Czerwinski SA, Chumlea WC, Siervogel RM, Towne B (2007) Anatomical patterning of visceral adipose tissue: race, sex, and age variation. *Obesity (Silver Spring)* **15**: 2984-2993

- Desai M, Jellyman JK, Ross MG (2015) Epigenomics, gestational programming and risk of metabolic syndrome. *Int J Obes (Lond)* **39**: 633-641
- Ding EL, Song Y, Malik VS, Liu S (2006) Sex differences of endogenous sex hormones and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *JAMA : the journal of the American Medical Association* **295**: 1288-1299
- Divoux A, Clement K (2011) Architecture and the extracellular matrix: the still unappreciated components of the adipose tissue. *Obes Rev* **12**: e494-503
- Divoux A, Tordjman J, Lacasa D, Veyrie N, Hugol D, Aissat A, Basdevant A, Guerre-Millo M, Poitou C, Zucker JD, Bedossa P, Clement K (2010) Fibrosis in human adipose tissue: composition, distribution, and link with lipid metabolism and fat mass loss. *Diabetes* **59**: 2817-2825
- Donath MY, Shoelson SE (2011) Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nature reviews Immunology* **11**: 98-107
- Drincic AT, Armas LA, Van Diest EE, Heaney RP (2012) Volumetric dilution, rather than sequestration best explains the low vitamin D status of obesity. *Obesity (Silver Spring)* **20**: 1444-1448
- Drolet R, Belanger C, Fortier M, Huot C, Mailloux J, Legare D, Tchernof A (2009) Fat depot-specific impact of visceral obesity on adipocyte adiponectin release in women. *Obesity (Silver Spring)* **17**: 424-430
- Emerging Risk Factors C, Wormser D, Kaptoge S, Di Angelantonio E, Wood AM, Pennells L, Thompson A, Sarwar N, Kizer JR, Lawlor DA, Nordestgaard BG, Ridker P, Salomaa V, Stevens J, Woodward M, Sattar N, Collins R, Thompson SG, Whitlock G, Danesh J (2011) Separate and combined associations of body-mass index and abdominal adiposity with cardiovascular disease: collaborative analysis of 58 prospective studies. *Lancet* **377**: 1085-1095
- Eng JK, McCormack AL, Yates JR (1994) An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **5**: 976-989
- Erman A, Veilleux A, Tchernof A, Goodyer CG (2011) Human growth hormone receptor (GHR) expression in obesity: I. GHR mRNA expression in omental and subcutaneous adipose tissues of obese women. *Int J Obes (Lond)* **35**: 1511-1519
- Escher G, Vogeli I, Escher R, Tuckey RC, Erickson S, Krozowski Z, Frey FJ (2009) Role of CYP27A1 in progesterone metabolism in vitro and in vivo. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* **297**: E949-955
- Esteve E, Ricart W, Fernandez-Real JM (2009) Adipocytokines and insulin resistance: the possible role of lipocalin-2, retinol binding protein-4, and adiponectin. *Diabetes Care* **32 Suppl 2**: S362-367
- Evans C, Noirel J, Ow SY, Salim M, Pereira-Medrano AG, Couto N, Pandhal J, Smith D, Pham TK, Karunakaran E, Zou X, Biggs CA, Wright PC (2012) An insight into iTRAQ: where do we stand now? *Anal Bioanal Chem* **404**: 1011-1027
- Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P, Bahouth SW (2004) Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology* **145**: 2273-2282

- Fairweather D, Frisancho-Kiss S, Rose NR (2008) Sex differences in autoimmune disease from a pathological perspective. *The American journal of pathology* **173**: 600-609
- Fang L, Kojima K, Zhou L, Crossman DK, Mobley JA, Grams J (2015) Analysis of the Human Proteome in Subcutaneous and Visceral Fat Depots in Diabetic and Non-diabetic Patients with Morbid Obesity. *J Proteomics Bioinform* **8**: 133-141
- Feldman D, Krishnan AV, Swami S, Giovannucci E, Feldman BJ (2014) The role of vitamin D in reducing cancer risk and progression. *Nat Rev Cancer* **14**: 342-357
- Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM (1989) Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* **246**: 64-71
- Fenselau C, Yao X (2007) Proteolytic labeling with ¹⁸O for comparative proteomics studies: preparation of ¹⁸O-labeled peptides and the ¹⁸O/¹⁶O peptide mixture. *Methods Mol Biol* **359**: 135-142
- Festa E, Fretz J, Berry R, Schmidt B, Rodeheffer M, Horowitz M, Horsley V (2011) Adipocyte lineage cells contribute to the skin stem cell niche to drive hair cycling. *Cell* **146**: 761-771
- Fink RI, Kolterman OG, Griffin J, Olefsky JM (1983) Mechanisms of insulin resistance in aging. *The Journal of clinical investigation* **71**: 1523-1535
- Fischer B, Schottl T, Schempp C, Fromme T, Hauner H, Klingenspor M, Skurk T (2015) Inverse relationship between body mass index and mitochondrial oxidative phosphorylation capacity in human subcutaneous adipocytes. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* **309**: E380-387
- Fontana L, Eagon JC, Trujillo ME, Scherer PE, Klein S (2007) Visceral fat adipokine secretion is associated with systemic inflammation in obese humans. *Diabetes* **56**: 1010-1013
- Forner F, Foster LJ, Campanaro S, Valle G, Mann M (2006) Quantitative proteomic comparison of rat mitochondria from muscle, heart, and liver. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **5**: 608-619
- Forner F, Kumar C, Lubber CA, Fromme T, Klingenspor M, Mann M (2009) Proteome differences between brown and white fat mitochondria reveal specialized metabolic functions. *Cell metabolism* **10**: 324-335
- Foster LJ, de Hoog CL, Zhang Y, Zhang Y, Xie X, Mootha VK, Mann M (2006) A mammalian organelle map by protein correlation profiling. *Cell* **125**: 187-199
- Fox CS, Massaro JM, Hoffmann U, Pou KM, Maurovich-Horvat P, Liu CY, Vasan RS, Murabito JM, Meigs JB, Cupples LA, D'Agostino RB, Sr., O'Donnell CJ (2007) Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue compartments: association with metabolic risk factors in the Framingham Heart Study. *Circulation* **116**: 39-48
- Frayn KN, Karpe F, Fielding BA, Macdonald IA, Coppack SW (2003) Integrative physiology of human adipose tissue. *Int J Obes Relat Metab Disord* **27**: 875-888
- Fridovich I (1999) Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? *Annals of the New York Academy of Sciences* **893**: 13-18
- Fruhbeck G, Becerril S, Sainz N, Garrastachu P, Garcia-Velloso MJ (2009) BAT: a new target for human obesity? *Trends in pharmacological sciences* **30**: 387-396

- Fruhbeck G, Gomez-Ambrosi J, Salvador J (2001) Leptin-induced lipolysis opposes the tonic inhibition of endogenous adenosine in white adipocytes. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **15**: 333-340
- Fu S, Yang L, Li P, Hofmann O, Dicker L, Hide W, Lin X, Watkins SM, Ivanov AR, Hotamisligil GS (2011) Aberrant lipid metabolism disrupts calcium homeostasis causing liver endoplasmic reticulum stress in obesity. *Nature* **473**: 528-531
- Fukuhara A, Matsuda M, Nishizawa M, Segawa K, Tanaka M, Kishimoto K, Matsuki Y, Murakami M, Ichisaka T, Murakami H, Watanabe E, Takagi T, Akiyoshi M, Ohtsubo T, Kihara S, Yamashita S, Makishima M, Funahashi T, Yamanaka S, Hiramatsu R, Matsuzawa Y, Shimomura I (2005) Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science* **307**: 426-430
- Fukui M, Zhu BT (2010) Mitochondrial superoxide dismutase SOD2, but not cytosolic SOD1, plays a critical role in protection against glutamate-induced oxidative stress and cell death in HT22 neuronal cells. *Free radical biology & medicine* **48**: 821-830
- Galarraga M, Campion J, Munoz-Barrutia A, Boque N, Moreno H, Martinez JA, Milagro F, Ortiz-de-Solorzano C (2012) Adiposoftware: automated software for the analysis of white adipose tissue cellularity in histological sections. *Journal of lipid research* **53**: 2791-2796
- Gao AW, Canto C, Houtkooper RH (2014) Mitochondrial response to nutrient availability and its role in metabolic disease. *EMBO molecular medicine* **6**: 580-589
- Garcia-Marques F, Trevisan-Herraz M, Martinez-Martinez S, Camafeita E, Jorge I, Lopez JA, Mendez-Barbero N, Mendez-Ferrer S, Del Pozo MA, Ibanez B, Andres V, Sanchez-Madrid F, Redondo JM, Bonzon-Kulichenko E, Vazquez J (2016) A Novel Systems-Biology Algorithm for the Analysis of Coordinated Protein Responses Using Quantitative Proteomics. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **15**: 1740-1760
- Garcia OP (2012) Effect of vitamin A deficiency on the immune response in obesity. *The Proceedings of the Nutrition Society* **71**: 290-297
- Geer EB, Shen W (2009) Gender differences in insulin resistance, body composition, and energy balance. *Gender medicine* **6 Suppl 1**: 60-75
- Genova ML, Lenaz G (2015) The Interplay Between Respiratory Supercomplexes and ROS in Aging. *Antioxidants & redox signaling*
- Giorgi C, De Stefani D, Bononi A, Rizzuto R, Pinton P (2009) Structural and functional link between the mitochondrial network and the endoplasmic reticulum. *The international journal of biochemistry & cell biology* **41**: 1817-1827
- Go YM, Chandler JD, Jones DP (2015) The cysteine proteome. *Free radical biology & medicine* **84**: 227-245
- Goetzl EJ, Huang MC, Kon J, Patel K, Schwartz JB, Fast K, Ferrucci L, Madara K, Taub DD, Longo DL (2010) Gender specificity of altered human immune cytokine profiles in aging. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **24**: 3580-3589

- Gomez-Ambrosi J, Catalan V, Ramirez B, Rodriguez A, Colina I, Silva C, Rotellar F, Mugueta C, Gil MJ, Cienfuegos JA, Salvador J, Fruhbeck G (2007) Plasma osteopontin levels and expression in adipose tissue are increased in obesity. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **92**: 3719-3727
- Gomez-Ambrosi J, Catalan V, Rodriguez A, Ramirez B, Silva C, Gil MJ, Salvador J, Fruhbeck G (2010) Involvement of serum vascular endothelial growth factor family members in the development of obesity in mice and humans. *The Journal of nutritional biochemistry* **21**: 774-780
- Gomez-Serrano M, Camafeita E, Garcia-Santos E, Lopez JA, Rubio MA, Sanchez-Pernaute A, Torres A, Vazquez J, Peral B (2016) Proteome-wide alterations on adipose tissue from obese patients as age-, diabetes- and gender-specific hallmarks. *Sci Rep* **6**: 25756
- Gomez-Serrano M, Camafeita E, Lopez JA, Rubio MA, Breton I, Garcia-Consuegra I, Garcia-Santos E, Lago J, Sanchez-Pernaute A, Torres A, Vazquez J, Peral B (2017) Differential proteomic and oxidative profiles unveil dysfunctional protein import to adipocyte mitochondria in obesity-associated aging and diabetes. *Redox Biol* **11**: 415-428
- Gonzalez-Freire M, de Cabo R, Bernier M, Sollott SJ, Fabbri E, Navas P, Ferrucci L (2015) Reconsidering the Role of Mitochondria in Aging. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences* **70**: 1334-1342
- Goodpaster BH (2002) Measuring body fat distribution and content in humans. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* **5**: 481-487
- Goudarzi M, Ross MM, Zhou W, Van Meter A, Deng J, Martin LM, Martin C, Liotta L, Petricoin E, Ad N (2011) Development of a novel proteomic approach for mitochondrial proteomics from cardiac tissue from patients with atrial fibrillation. *Journal of proteome research* **10**: 3484-3492
- Graner M, Siren R, Nyman K, Lundbom J, Hakkarainen A, Pentikainen MO, Lauerma K, Lundbom N, Adiels M, Nieminen MS, Taskinen MR (2013) Cardiac steatosis associates with visceral obesity in nondiabetic obese men. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **98**: 1189-1197
- Green DR, Galluzzi L, Kroemer G (2011) Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging. *Science* **333**: 1109-1112
- Grossmann V, Schmitt VH, Zeller T, Panova-Noeva M, Schulz A, Laubert-Reh D, Juenger C, Schnabel RB, Abt TG, Laskowski R, Wiltink J, Schulz E, Blankenberg S, Lackner KJ, Munzel T, Wild PS (2015) Profile of the Immune and Inflammatory Response in Individuals With Prediabetes and Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* **38**: 1356-1364
- Gu J, Wu M, Guo R, Yan K, Lei J, Gao N, Yang M (2016) The architecture of the mammalian respirasome. *Nature* **537**: 639-643
- Guaras A, Perales-Clemente E, Calvo E, Acin-Perez R, Loureiro-Lopez M, Pujol C, Martinez-Carrascoso I, Nunez E, Garcia-Marques F, Rodriguez-Hernandez MA, Cortes A, Diaz F, Perez-Martos A, Moraes CT, Fernandez-Silva P, Trifunovic A, Navas P, Vazquez J, Enriquez JA (2016) The CoQH2/CoQ Ratio Serves as a Sensor of Respiratory Chain Efficiency. *Cell reports* **15**: 197-209
- Gubbels Bupp MR (2015) Sex, the aging immune system, and chronic disease. *Cellular immunology* **294**: 102-110

- Guerrero-Castillo S, Baertling F, Kownatzki D, Wessels HJ, Arnold S, Brandt U, Nijtmans L (2017) The Assembly Pathway of Mitochondrial Respiratory Chain Complex I. *Cell metabolism* **25**: 128-139
- Guevara R, Gianotti M, Oliver J, Roca P (2011) Age and sex-related changes in rat brain mitochondrial oxidative status. *Experimental gerontology* **46**: 923-928
- Guglielmi V, Cardellini M, Cinti F, Corgosinho F, Cardolini I, D'Adamo M, Zingaretti MC, Bellia A, Lauro D, Gentileschi P, Federici M, Cinti S, Sbraccia P (2015) Omental adipose tissue fibrosis and insulin resistance in severe obesity. *Nutr Diabetes* **5**: e175
- Guilherme A, Virbasius JV, Puri V, Czech MP (2008) Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature reviews Molecular cell biology* **9**: 367-377
- Guo L, Li X, Tang QQ (2015) Transcriptional regulation of adipocyte differentiation: a central role for CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) beta. *The Journal of biological chemistry* **290**: 755-761
- Gupta S, Allen-Vercoe E, Petrof EO (2016) Fecal microbiota transplantation: in perspective. *Therap Adv Gastroenterol* **9**: 229-239
- Gustafson B, Gogg S, Hedjazifar S, Jenndahl L, Hammarstedt A, Smith U (2009) Inflammation and impaired adipogenesis in hypertrophic obesity in man. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* **297**: E999-E1003
- Gygi SP, Rist B, Gerber SA, Turecek F, Gelb MH, Aebersold R (1999) Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nature biotechnology* **17**: 994-999
- Halade GV, Jin YF, Lindsey ML (2013) Matrix metalloproteinase (MMP)-9: a proximal biomarker for cardiac remodeling and a distal biomarker for inflammation. *Pharmacol Ther* **139**: 32-40
- Halberg N, Khan T, Trujillo ME, Wernstedt-Asterholm I, Attie AD, Sherwani S, Wang ZV, Landskroner-Eiger S, Dineen S, Magalang UJ, Brekken RA, Scherer PE (2009) Hypoxia-inducible factor 1alpha induces fibrosis and insulin resistance in white adipose tissue. *Molecular and cellular biology* **29**: 4467-4483
- Han TS, McNeill G, Seidell JC, Lean ME (1997) Predicting intra-abdominal fatness from anthropometric measures: the influence of stature. *Int J Obes Relat Metab Disord* **21**: 587-593
- Han YH, Buffolo M, Pires KM, Pei S, Scherer PE, Boudina S (2016) Adipocyte-Specific Deletion of Manganese Superoxide Dismutase Protects From Diet-Induced Obesity Through Increased Mitochondrial Uncoupling and Biogenesis. *Diabetes* **65**: 2639-2651
- Hansson J, Rafiee MR, Reiland S, Polo JM, Gehring J, Okawa S, Huber W, Hochedlinger K, Krijgsveld J (2012) Highly coordinated proteome dynamics during reprogramming of somatic cells to pluripotency. *Cell reports* **2**: 1579-1592
- Harries LW, Hernandez D, Henley W, Wood AR, Holly AC, Bradley-Smith RM, Yaghootkar H, Dutta A, Murray A, Frayling TM, Guralnik JM, Bandinelli S, Singleton A, Ferrucci L, Melzer D (2011) Human aging is characterized by focused changes in gene expression and deregulation of alternative splicing. *Aging cell* **10**: 868-878
- Hayward JS, Lisson PA (1992) Evolution of brown fat: its absence in marsupials and monotremes. *Canadian Journal of Zoology* **70**: 171-179

- Heinonen S, Buzkova J, Muniandy M, Kaksonen R, Ollikainen M, Ismail K, Hakkarainen A, Lundbom J, Lundbom N, Vuolteenaho K, Moilanen E, Kaprio J, Rissanen A, Suomalainen A, Pietilainen KH (2015) Impaired Mitochondrial Biogenesis in Adipose Tissue in Acquired Obesity. *Diabetes* **64**: 3135-3145
- Heiss G, Tamir I, Davis CE, Tyroler HA, Rifkind BM, Schonfeld G, Jacobs D, Frantz ID, Jr. (1980) Lipoprotein-cholesterol distributions in selected North American populations: the lipid research clinics program prevalence study. *Circulation* **61**: 302-315
- Heitmann BL (1992) The effects of gender and age on associations between blood lipid levels and obesity in Danish men and women aged 35-65 years. *J Clin Epidemiol* **45**: 693-702
- Hellmer J, Marcus C, Sonnenfeld T, Arner P (1992) Mechanisms for differences in lipolysis between human subcutaneous and omental fat cells. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **75**: 15-20
- Henegar C, Tordjman J, Achard V, Lacasa D, Cremer I, Guerre-Millo M, Poitou C, Basdevant A, Stich V, Viguerie N, Langin D, Bedossa P, Zucker JD, Clement K (2008) Adipose tissue transcriptomic signature highlights the pathological relevance of extracellular matrix in human obesity. *Genome Biol* **9**: R14
- Hiltunen JK, Autio KJ, Schonauer MS, Kursu VA, Dieckmann CL, Kastaniotis AJ (2010) Mitochondrial fatty acid synthesis and respiration. *Biochimica et biophysica acta* **1797**: 1195-1202
- Hiltunen JK, Schonauer MS, Autio KJ, Mittelmeier TM, Kastaniotis AJ, Dieckmann CL (2009) Mitochondrial fatty acid synthesis type II: more than just fatty acids. *The Journal of biological chemistry* **284**: 9011-9015
- Hoeke G, Kooijman S, Boon MR, Rensen PC, Berbee JF (2016) Role of Brown Fat in Lipoprotein Metabolism and Atherosclerosis. *Circulation research* **118**: 173-182
- Hoffstedt J, Arner E, Wahrenberg H, Andersson DP, Qvist V, Lofgren P, Ryden M, Thorne A, Wiren M, Palmer M, Thorell A, Toft E, Arner P (2010) Regional impact of adipose tissue morphology on the metabolic profile in morbid obesity. *Diabetologia* **53**: 2496-2503
- Holmstrom KM, Finkel T (2014) Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nature reviews Molecular cell biology* **15**: 411-421
- Holmstrom MH, Iglesias-Gutierrez E, Zierath JR, Garcia-Roves PM (2012) Tissue-specific control of mitochondrial respiration in obesity-related insulin resistance and diabetes. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* **302**: E731-739
- Hotamisligil GS (2006) Inflammation and metabolic disorders. *Nature* **444**: 860-867
- Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM (1993) Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* **259**: 87-91
- Hsieh CJ, Weng SW, Liou CW, Lin TK, Chen JB, Tiao MM, Hung YT, Chen IY, Huang WT, Wang PW (2011) Tissue-specific differences in mitochondrial DNA content in type 2 diabetes. *Diabetes research and clinical practice* **92**: 106-110
- Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA (2009a) Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic acids research* **37**: 1-13
- Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA (2009b) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature protocols* **4**: 44-57

- Hulsen T, de Vlieg J, Alkema W (2008) BioVenn - a web application for the comparison and visualization of biological lists using area-proportional Venn diagrams. *BMC Genomics* **9**: 488
- Hwang H, Bowen BP, Lefort N, Flynn CR, De Filippis EA, Roberts C, Smoke CC, Meyer C, Hojlund K, Yi Z, Mandarino LJ (2010) Proteomics analysis of human skeletal muscle reveals novel abnormalities in obesity and type 2 diabetes. *Diabetes* **59**: 33-42
- Ingram T, Chakrabarti L (2016) Proteomic profiling of mitochondria: what does it tell us about the ageing brain? *Aging* **8**: 3161-3179
- James AM, Collins Y, Logan A, Murphy MP (2012) Mitochondrial oxidative stress and the metabolic syndrome. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* **23**: 429-434
- Jia J, Zhang L, Shi X, Wu M, Zhou X, Liu X, Huo T (2016) SOD2 Mediates Amifostine-Induced Protection against Glutamate in PC12 Cells. *Oxidative medicine and cellular longevity* **2016**: 4202437
- Johnson DT, Harris RA, Blair PV, Balaban RS (2007a) Functional consequences of mitochondrial proteome heterogeneity. *Am J Physiol Cell Physiol* **292**: C698-707
- Johnson DT, Harris RA, French S, Blair PV, You J, Bemis KG, Wang M, Balaban RS (2007b) Tissue heterogeneity of the mammalian mitochondrial proteome. *Am J Physiol Cell Physiol* **292**: C689-697
- Jones G, Prosser DE (2011) Chapter 3 - The Activating Enzymes of Vitamin D Metabolism (25- and 1 α -Hydroxylases). In *Vitamin D (Third Edition)*, pp 23-42. San Diego: Academic Press
- Kanaley JA, Sames C, Swisher L, Swick AG, Ploutz-Snyder LL, Stepan CM, Sagendorf KS, Feiglin D, Jaynes EB, Meyer RA, Weinstock RS (2001) Abdominal fat distribution in pre- and postmenopausal women: The impact of physical activity, age, and menopausal status. *Metabolism* **50**: 976-982
- Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Kotani K, Hiasa K, Kitazawa R, Kitazawa S, Miyachi H, Maeda S, Egashira K, Kasuga M (2006) MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *The Journal of clinical investigation* **116**: 1494-1505
- Kanehisa M, Goto S, Kawashima S, Okuno Y, Hattori M (2004) The KEGG resource for deciphering the genome. *Nucleic acids research* **32**: D277-280
- Kao TM, Hsieh SM, Kung HC, Lee YC, Huang KC, Huang LM, Chang FY, Wang NC, Liu YC, Lee WS, Liu HE, Chen CI, Chen CH (2010) Immune response of single dose vaccination against 2009 pandemic influenza A (H1N1) in the Taiwanese elderly. *Vaccine* **28**: 6159-6163
- Karas M, Hillenkamp F (1988) Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Analytical chemistry* **60**: 2299-2301
- Karastergiou K, Smith SR, Greenberg AS, Fried SK (2012) Sex differences in human adipose tissues - the biology of pear shape. *Biology of sex differences* **3**: 13
- Keeney JT, Butterfield DA (2015) Vitamin D deficiency and Alzheimer disease: Common links. *Neurobiol Dis* **84**: 84-98
- Kehrl JH (1991) Transforming growth factor-beta: an important mediator of immunoregulation. *Int J Cell Cloning* **9**: 438-450

- Kelley DE, He J, Menshikova EV, Ritov VB (2002) Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes* **51**: 2944-2950
- Kershaw EE, Flier JS (2004) Adipose tissue as an endocrine organ. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **89**: 2548-2556
- Ketterer C, Tschritter O, Preissl H, Heni M, Haring HU, Fritsche A (2011) Insulin sensitivity of the human brain. *Diabetes research and clinical practice* **93 Suppl 1**: S47-51
- Keuper M, Bluher M, Schon MR, Moller P, Dzyakanchuk A, Amrein K, Debatin KM, Wabitsch M, Fischer-Posovszky P (2011) An inflammatory micro-environment promotes human adipocyte apoptosis. *Molecular and cellular endocrinology* **339**: 105-113
- Khan T, Muise ES, Iyengar P, Wang ZV, Chandalia M, Abate N, Zhang BB, Bonaldo P, Chua S, Scherer PE (2009) Metabolic dysregulation and adipose tissue fibrosis: role of collagen VI. *Molecular and cellular biology* **29**: 1575-1591
- Kharitonov A, Shiyanova TL, Koester A, Ford AM, Micanovic R, Galbreath EJ, Sandusky GE, Hammond LJ, Moyers JS, Owens RA, Gromada J, Brozinick JT, Hawkins ED, Wroblewski VJ, Li DS, Mehrbod F, Jaskunas SR, Shanafelt AB (2005) FGF-21 as a novel metabolic regulator. *The Journal of clinical investigation* **115**: 1627-1635
- Kim EY, Kim WK, Oh KJ, Han BS, Lee SC, Bae KH (2015) Recent advances in proteomic studies of adipose tissues and adipocytes. *International journal of molecular sciences* **16**: 4581-4599
- Kim J, Choi YS, Lim S, Yea K, Yoon JH, Jun DJ, Ha SH, Kim JW, Kim JH, Suh PG, Ryu SH, Lee TG (2010) Comparative analysis of the secretory proteome of human adipose stromal vascular fraction cells during adipogenesis. *Proteomics* **10**: 394-405
- Kim SJ, Chae S, Kim H, Mun DG, Back S, Choi HY, Park KS, Hwang D, Choi SH, Lee SW (2014) A protein profile of visceral adipose tissues linked to early pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **13**: 811-822
- Kinter M, Sherman NE (2000) *Protein sequencing and identification using tandem mass spectrometry*, New York: John Wiley.
- Klipp E, Liebermeister W, Wierling C, Kowald A, Lehrach H, Herwig R (2009) *Systems Biology: A Textbook*: John Wiley & Sons.
- Koliaki C, Roden M (2016) Alterations of Mitochondrial Function and Insulin Sensitivity in Human Obesity and Diabetes Mellitus. *Annu Rev Nutr* **36**: 337-367
- Kotani K, Tokunaga K, Fujioka S, Kobatake T, Keno Y, Yoshida S, Shimomura I, Tarui S, Matsuzawa Y (1994) Sexual dimorphism of age-related changes in whole-body fat distribution in the obese. *Int J Obes Relat Metab Disord* **18**: 207-202
- Kowaltowski AJ, de Souza-Pinto NC, Castilho RF, Vercesi AE (2009) Mitochondria and reactive oxygen species. *Free radical biology & medicine* **47**: 333-343
- Krotkiewski M, Bjorntorp P, Sjostrom L, Smith U (1983) Impact of obesity on metabolism in men and women. Importance of regional adipose tissue distribution. *The Journal of clinical investigation* **72**: 1150-1162

- Kumada M, Kihara S, Ouchi N, Kobayashi H, Okamoto Y, Ohashi K, Maeda K, Nagaretani H, Kishida K, Maeda N, Nagasawa A, Funahashi T, Matsuzawa Y (2004) Adiponectin specifically increased tissue inhibitor of metalloproteinase-1 through interleukin-10 expression in human macrophages. *Circulation* **109**: 2046-2049
- Kusminski CM, Scherer PE (2012) Mitochondrial dysfunction in white adipose tissue. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* **23**: 435-443
- Lapiente-Brun E, Moreno-Loshuertos R, Acin-Perez R, Latorre-Pellicer A, Colas C, Balsa E, Perales-Clemente E, Quiros PM, Calvo E, Rodriguez-Hernandez MA, Navas P, Cruz R, Carracedo A, Lopez-Otin C, Perez-Martos A, Fernandez-Silva P, Fernandez-Vizarra E, Enriquez JA (2013) Supercomplex assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain. *Science* **340**: 1567-1570
- Larsen CM, Faulenbach M, Vaag A, Volund A, Eshes JA, Seifert B, Mandrup-Poulsen T, Donath MY (2007) Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus. *The New England journal of medicine* **356**: 1517-1526
- Larson K, Yan SJ, Tsurumi A, Liu J, Zhou J, Gaur K, Guo D, Eickbush TH, Li WX (2012) Heterochromatin formation promotes longevity and represses ribosomal RNA synthesis. *PLoS Genet* **8**: e1002473
- Larsson NG, Wang J, Wilhelmsson H, Oldfors A, Rustin P, Lewandoski M, Barsh GS, Clayton DA (1998) Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice. *Nat Genet* **18**: 231-236
- Lasselun J, Magne E, Beau C, Ledaguenel P, Dexpert S, Aubert A, Laye S, Capuron L (2014) Adipose inflammation in obesity: relationship with circulating levels of inflammatory markers and association with surgery-induced weight loss. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **99**: E53-61
- Lee JE, Park JH, Moon PG, Baek MC (2013) Identification of differentially expressed proteins by treatment with PUGNAc in 3T3-L1 adipocytes through analysis of ATP-binding proteome. *Proteomics* **13**: 2998-3012
- Lefort N, Yi Z, Bowen B, Glancy B, De Filippis EA, Mapes R, Hwang H, Flynn CR, Willis WT, Civitarese A, Hojlund K, Mandarino LJ (2009) Proteome profile of functional mitochondria from human skeletal muscle using one-dimensional gel electrophoresis and HPLC-ESI-MS/MS. *Journal of proteomics* **72**: 1046-1060
- Lenicke C, Rahn J, Heimer N, Lichtenfels R, Wessjohann LA, Seliger B (2016) Redox proteomics: Methods for the identification and enrichment of redox-modified proteins and their applications. *Proteomics* **16**: 197-213
- Letts JA, Fiedorczuk K, Sazanov LA (2016) The architecture of respiratory supercomplexes. *Nature* **537**: 644-648
- Li Z, Adams RM, Chourey K, Hurst GB, Hettich RL, Pan C (2012) Systematic comparison of label-free, metabolic labeling, and isobaric chemical labeling for quantitative proteomics on LTQ Orbitrap Velos. *Journal of proteome research* **11**: 1582-1590
- Lindinger A, Peterli R, Peters T, Kern B, von Flue M, Calame M, Hoch M, Eberle AN, Lindinger PW (2010) Mitochondrial DNA content in human omental adipose tissue. *Obesity surgery* **20**: 84-92
- Lindinger PW, Christe M, Eberle AN, Kern B, Peterli R, Peters T, Jayawardene KJ, Fearnley IM, Walker JE (2015) Important mitochondrial proteins in human omental adipose tissue show reduced expression in obesity. *Journal of proteomics* **124**: 79-87

- Link AJ, Eng J, Schieltz DM, Carmack E, Mize GJ, Morris DR, Garvik BM, Yates JR, 3rd (1999) Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nature biotechnology* **17**: 676-682
- Liu Y, Qi W, Richardson A, Van Remmen H, Ikeno Y, Salmon AB (2013) Oxidative damage associated with obesity is prevented by overexpression of CuZn- or Mn-superoxide dismutase. *Biochemical and biophysical research communications* **438**: 78-83
- Lolmede K, Durand de Saint Front V, Galitzky J, Lafontan M, Bouloumie A (2003) Effects of hypoxia on the expression of proangiogenic factors in differentiated 3T3-F442A adipocytes. *Int J Obes Relat Metab Disord* **27**: 1187-1195
- Lopez-Ferrer D, Ramos-Fernandez A, Martinez-Bartolome S, Garcia-Ruiz P, Vazquez J (2006) Quantitative proteomics using 16O/18O labeling and linear ion trap mass spectrometry. *Proteomics* **6 Suppl 1**: S4-11
- Lopez-Otin C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G (2013) The hallmarks of aging. *Cell* **153**: 1194-1217
- Luo R, Zhao H (2012) Protein quantitation using iTRAQ: Review on the sources of variations and analysis of nonrandom missingness. *Statistics and its interface* **5**: 99-107
- Maachi M, Pieroni L, Bruckert E, Jardel C, Fellahi S, Hainque B, Capeau J, Bastard JP (2004) Systemic low-grade inflammation is related to both circulating and adipose tissue TNFalpha, leptin and IL-6 levels in obese women. *Int J Obes Relat Metab Disord* **28**: 993-997
- Maeda N, Shimomura I, Kishida K, Nishizawa H, Matsuda M, Nagaretani H, Furuyama N, Kondo H, Takahashi M, Arita Y, Komuro R, Ouchi N, Kihara S, Tochino Y, Okutomi K, Horie M, Takeda S, Aoyama T, Funahashi T, Matsuzawa Y (2002) Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nature medicine* **8**: 731-737
- Mariman EC, Wang P (2010) Adipocyte extracellular matrix composition, dynamics and role in obesity. *Cell Mol Life Sci* **67**: 1277-1292
- Martinez-Acedo P, Nunez E, Gomez FJ, Moreno M, Ramos E, Izquierdo-Alvarez A, Miro-Casas E, Mesa R, Rodriguez P, Martinez-Ruiz A, Dorado DG, Lamas S, Vazquez J (2012) A novel strategy for global analysis of the dynamic thiol redox proteome. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **11**: 800-813
- Martinez-Bartolome S, Navarro P, Martin-Maroto F, Lopez-Ferrer D, Ramos-Fernandez A, Villar M, Garcia-Ruiz JP, Vazquez J (2008) Properties of average score distributions of SEQUEST: the probability ratio method. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **7**: 1135-1145
- Massiera F, Bloch-Faure M, Ceiler D, Murakami K, Fukamizu A, Gasc JM, Quignard-Boulangue A, Negrel R, Ailhaud G, Seydoux J, Meneton P, Teboul M (2001) Adipose angiotensinogen is involved in adipose tissue growth and blood pressure regulation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **15**: 2727-2729
- Mattison JA, Roth GS, Beasley TM, Tilmont EM, Handy AM, Herbert RL, Longo DL, Allison DB, Young JE, Bryant M, Barnard D, Ward WF, Qi W, Ingram DK, de Cabo R (2012) Impact of caloric restriction on health and survival in rhesus monkeys from the NIA study. *Nature* **489**: 318-321

- McDonagh B, Martinez-Acedo P, Vazquez J, Padilla CA, Sheehan D, Barcena JA (2012) Application of iTRAQ Reagents to Relatively Quantify the Reversible Redox State of Cysteine Residues. *International journal of proteomics* **2012**: 514847
- McGill JB, Vljajnic A, Knutsen PG, Recklein C, Rimler M, Fisher SJ (2013) Effect of gender on treatment outcomes in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes research and clinical practice* **102**: 167-174
- McHugh L, Arthur JW (2008) Computational methods for protein identification from mass spectrometry data. *PLoS Comput Biol* **4**: e12
- Mick DU, Fox TD, Rehling P (2011) Inventory control: cytochrome c oxidase assembly regulates mitochondrial translation. *Nature reviews Molecular cell biology* **12**: 14-20
- Miersch C, Doring F (2013) Sex differences in body composition, fat storage, and gene expression profile in *Caenorhabditis elegans* in response to dietary restriction. *Physiol Genomics* **45**: 539-551
- Mimaki M, Wang X, McKenzie M, Thorburn DR, Ryan MT (2012) Understanding mitochondrial complex I assembly in health and disease. *Biochimica et biophysica acta* **1817**: 851-862
- Miquel J, Economos AC, Fleming J, Johnson JE, Jr. (1980) Mitochondrial role in cell aging. *Experimental gerontology* **15**: 575-591
- Modjtahedi N, Tokatlidis K, Dessen P, Kroemer G (2016) Mitochondrial Proteins Containing Coiled-Coil-Helix-Coiled-Coil-Helix (CHCH) Domains in Health and Disease. *Trends in biochemical sciences* **41**: 245-260
- Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, Katz DR, Miles JM, Yudkin JS, Klein S, Coppack SW (1997) Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **82**: 4196-4200
- Montes-Nieto R, Insenser M, Martinez-Garcia MA, Escobar-Morreale HF (2013) A nontargeted proteomic study of the influence of androgen excess on human visceral and subcutaneous adipose tissue proteomes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **98**: E576-585
- Moon HE, Paek SH (2015) Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease. *Experimental neurobiology* **24**: 103-116
- Moreno-Lastres D, Fontanesi F, Garcia-Consuegra I, Martin MA, Arenas J, Barrientos A, Ugalde C (2012) Mitochondrial complex I plays an essential role in human respirasome assembly. *Cell metabolism* **15**: 324-335
- Mori S, Kiuchi S, Ouchi A, Hase T, Murase T (2014) Characteristic expression of extracellular matrix in subcutaneous adipose tissue development and adipogenesis; comparison with visceral adipose tissue. *Int J Biol Sci* **10**: 825-833
- Morino K, Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Frattini J, Shatzkes N, Neschen S, White MF, Bilz S, Sono S, Pypaert M, Shulman GI (2005) Reduced mitochondrial density and increased IRS-1 serine phosphorylation in muscle of insulin-resistant offspring of type 2 diabetic parents. *The Journal of clinical investigation* **115**: 3587-3593
- Mortensen OH, Nielsen AR, Erikstrup C, Plomgaard P, Fischer CP, Krogh-Madsen R, Lindegaard B, Petersen AM, Taudorf S, Pedersen BK (2009) Calprotectin--a novel marker of obesity. *PLoS one* **4**: e7419

- Mourier A, Matic S, Ruzzenente B, Larsson NG, Milenkovic D (2014) The respiratory chain supercomplex organization is independent of COX7a2l isoforms. *Cell metabolism* **20**: 1069-1075
- Mozos I, Marginean O (2015) Links between Vitamin D Deficiency and Cardiovascular Diseases. *BioMed research international* **2015**: 109275
- Muir LA, Neeley CK, Meyer KA, Baker NA, Brosius AM, Washabaugh AR, Varban OA, Finks JF, Zamarron BF, Fleisher CG, Chang JS, DelProposto JB, Geletka L, Martinez-Santibanez G, Kaciroti N, Lumeng CN, O'Rourke RW (2016) Adipose tissue fibrosis, hypertrophy, and hyperplasia: Correlations with diabetes in human obesity. *Obesity (Silver Spring)* **24**: 597-605
- Mukherjee R, Choi JW, Choi DK, Oh TS, Liu H, Yun JW (2012) Gender-dependent protein expression in white adipose tissues of lean and obese rats fed a high fat diet. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* **29**: 617-634
- Murri M, Insenser M, Bernal-Lopez MR, Perez-Martinez P, Escobar-Morreale HF, Tinahones FJ (2013) Proteomic analysis of visceral adipose tissue in pre-obese patients with type 2 diabetes. *Molecular and cellular endocrinology* **376**: 99-106
- Murri M, Insenser M, Luque M, Tinahones FJ, Escobar-Morreale HF (2014) Proteomic analysis of adipose tissue: informing diabetes research. *Expert review of proteomics* **11**: 491-502
- Nandi A, Chen Z, Patel R, Poretsky L (2014) Polycystic ovary syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am* **43**: 123-147
- Navarro P, Trevisan-Herraz M, Bonzon-Kulichenko E, Nunez E, Martinez-Acedo P, Perez-Hernandez D, Jorge I, Mesa R, Calvo E, Carrascal M, Hernaez ML, Garcia F, Barcena JA, Ashman K, Abian J, Gil C, Redondo JM, Vazquez J (2014) General statistical framework for quantitative proteomics by stable isotope labeling. *Journal of proteome research* **13**: 1234-1247
- Navarro P, Vazquez J (2009) A refined method to calculate false discovery rates for peptide identification using decoy databases. *Journal of proteome research* **8**: 1792-1796
- NCD-RisC (2016) Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19'2 million participants. *The Lancet* **387**: 1377-1396
- Neeland IJ, Turer AT, Ayers CR, Powell-Wiley TM, Vega GL, Farzaneh-Far R, Grundy SM, Khera A, McGuire DK, de Lemos JA (2012) Dysfunctional adiposity and the risk of prediabetes and type 2 diabetes in obese adults. *JAMA : the journal of the American Medical Association* **308**: 1150-1159
- Nelson ER, Wardell SE, Jasper JS, Park S, Suchindran S, Howe MK, Carver NJ, Pillai RV, Sullivan PM, Sondhi V, Umetani M, Geradts J, McDonnell DP (2013) 27-Hydroxycholesterol links hypercholesterolemia and breast cancer pathophysiology. *Science* **342**: 1094-1098
- Nelson G, Wordsworth J, Wang C, Jurk D, Lawless C, Martin-Ruiz C, von Zglinicki T (2012) A senescent cell bystander effect: senescence-induced senescence. *Aging cell* **11**: 345-349
- Nesvizhskii AI, Aebersold R (2005) Interpretation of shotgun proteomic data: the protein inference problem. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **4**: 1419-1440

- Newton BW, Cologna SM, Moya C, Russell DH, Russell WK, Jayaraman A (2011) Proteomic analysis of 3T3-L1 adipocyte mitochondria during differentiation and enlargement. *Journal of proteome research* **10**: 4692-4702
- Nikolopoulou A, Kadoglou NP (2012) Obesity and metabolic syndrome as related to cardiovascular disease. *Expert review of cardiovascular therapy* **10**: 933-939
- Nikolov M, Schmidt C, Urlaub H (2012) Quantitative mass spectrometry-based proteomics: an overview. *Methods Mol Biol* **893**: 85-100
- Oberley LW (2005) Mechanism of the tumor suppressive effect of MnSOD overexpression. *Biomed Pharmacother* **59**: 143-148
- Ong SE, Blagoev B, Kratchmarova I, Kristensen DB, Steen H, Pandey A, Mann M (2002) Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **1**: 376-386
- Ortega FJ, Mercader JM, Moreno-Navarrete JM, Sabater M, Pueyo N, Valdes S, Ruiz B, Luche E, Serino M, Naon D, Ricart W, Botas P, Delgado E, Burcelin R, Fruhbeck G, Bosch F, Mingrone G, Zorzano A, Fernandez-Real JM (2013) Targeting the association of calgranulin B (S100A9) with insulin resistance and type 2 diabetes. *Journal of molecular medicine* **91**: 523-534
- Ortega FJ, Moreno-Navarrete JM, Ribas V, Esteve E, Rodriguez-Hermosa JI, Ruiz B, Peral B, Ricart W, Zorzano A, Fernandez-Real JM (2009) Subcutaneous fat shows higher thyroid hormone receptor-alpha1 gene expression than omental fat. *Obesity (Silver Spring)* **17**: 2134-2141
- Oswald ES, Brown LM, Bulinski JC, Hung CT (2011) Label-free protein profiling of adipose-derived human stem cells under hyperosmotic treatment. *Journal of proteome research* **10**: 3050-3059
- Otto TC, Lane MD (2005) Adipose development: from stem cell to adipocyte. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **40**: 229-242
- Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K (2011) Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nature reviews Immunology* **11**: 85-97
- Pagliarini DJ, Calvo SE, Chang B, Sheth SA, Vafai SB, Ong SE, Walford GA, Sugiana C, Boneh A, Chen WK, Hill DE, Vidal M, Evans JG, Thorburn DR, Carr SA, Mootha VK (2008) A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology. *Cell* **134**: 112-123
- Pajares M, Jimenez-Moreno N, Dias IH, Debele B, Vucetic M, Fladmark KE, Basaga H, Ribaric S, Milisavl I, Cuadrado A (2015) Redox control of protein degradation. *Redox Biol* **6**: 409-420
- Palmer BF, Clegg DJ (2015) The sexual dimorphism of obesity. *Molecular and cellular endocrinology* **402**: 113-119
- Paradies G, Petrosillo G, Paradies V, Ruggiero FM (2009) Role of cardiolipin peroxidation and Ca²⁺ in mitochondrial dysfunction and disease. *Cell calcium* **45**: 643-650
- Park HS, Park JY, Yu R (2005) Relationship of obesity and visceral adiposity with serum concentrations of CRP, TNF-alpha and IL-6. *Diabetes research and clinical practice* **69**: 29-35

- Pasarica M, Gowronska-Kozak B, Burk D, Remedios I, Hymel D, Gimble J, Ravussin E, Bray GA, Smith SR (2009) Adipose tissue collagen VI in obesity. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **94**: 5155-5162
- Pascot A, Lemieux S, Lemieux I, Prud'homme D, Tremblay A, Bouchard C, Nadeau A, Couillard C, Tchernof A, Bergeron J, Despres JP (1999) Age-related increase in visceral adipose tissue and body fat and the metabolic risk profile of premenopausal women. *Diabetes Care* **22**: 1471-1478
- Patergnani S, Suski JM, Agnoletto C, Bononi A, Bonora M, De Marchi E, Giorgi C, Marchi S, Missiroli S, Poletti F, Rimessi A, Duszynski J, Wieckowski MR, Pinton P (2011) Calcium signaling around Mitochondria Associated Membranes (MAMs). *Cell communication and signaling : CCS* **9**: 19
- Patti ME, Corvera S (2010) The role of mitochondria in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Endocrine reviews* **31**: 364-395
- Pegoraro G, Kubben N, Wickert U, Gohler H, Hoffmann K, Misteli T (2009) Ageing-related chromatin defects through loss of the NURD complex. *Nature cell biology* **11**: 1261-1267
- Peinado JR, Diaz-Ruiz A, Fruhbeck G, Malagon MM (2014) Mitochondria in metabolic disease: getting clues from proteomic studies. *Proteomics* **14**: 452-466
- Peinado JR, Jimenez-Gomez Y, Pulido MR, Ortega-Bellido M, Diaz-Lopez C, Padillo FJ, Lopez-Miranda J, Vazquez-Martinez R, Malagon MM (2010) The stromal-vascular fraction of adipose tissue contributes to major differences between subcutaneous and visceral fat depots. *Proteomics* **10**: 3356-3366
- Peinado JR, Pardo M, de la Rosa O, Malagon MM (2012) Proteomic characterization of adipose tissue constituents, a necessary step for understanding adipose tissue complexity. *Proteomics* **12**: 607-620
- Pereira SE, Saboya CJ, Saunders C, Ramalho A (2012) Serum levels and liver store of retinol and their association with night blindness in individuals with class III obesity. *Obesity surgery* **22**: 602-608
- Perez-Perez R, Garcia-Santos E, Ortega-Delgado FJ, Lopez JA, Camafeita E, Ricart W, Fernandez-Real JM, Peral B (2012a) Attenuated metabolism is a hallmark of obesity as revealed by comparative proteomic analysis of human omental adipose tissue. *Journal of proteomics* **75**: 783-795
- Perez-Perez R, Lopez JA, Garcia-Santos E, Camafeita E, Gomez-Serrano M, Ortega-Delgado FJ, Ricart W, Fernandez-Real JM, Peral B (2012b) Uncovering suitable reference proteins for expression studies in human adipose tissue with relevance to obesity. *PLoS one* **7**: e30326
- Perez-Perez R, Ortega-Delgado FJ, Garcia-Santos E, Lopez JA, Camafeita E, Ricart W, Fernandez-Real JM, Peral B (2009) Differential proteomics of omental and subcutaneous adipose tissue reflects their unlike biochemical and metabolic properties. *Journal of proteome research* **8**: 1682-1693
- Perluigi M, Swomley AM, Butterfield DA (2014) Redox proteomics and the dynamic molecular landscape of the aging brain. *Ageing research reviews* **13**: 75-89
- Pesce V, Cormio A, Fracasso F, Lezza AM, Cantatore P, Gadaleta MN (2005) Age-related changes of mitochondrial DNA content and mitochondrial genotypic and phenotypic alterations in rat hind-limb skeletal muscles. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences* **60**: 715-723
- Pessin JE, Kwon H (2012) How does high-fat diet induce adipose tissue fibrosis? *Journal of investigative medicine : the official publication of the American Federation for Clinical Research* **60**: 1147-1150

- Picca A, Pesce V, Fracasso F, Joseph AM, Leeuwenburgh C, Lezza AM (2013) Aging and calorie restriction oppositely affect mitochondrial biogenesis through TFAM binding at both origins of mitochondrial DNA replication in rat liver. *PLoS one* **8**: e74644
- Pietilainen KH, Naukkarinen J, Rissanen A, Saharinen J, Ellonen P, Keranen H, Suomalainen A, Gotz A, Suortti T, Yki-Jarvinen H, Oresic M, Kaprio J, Peltonen L (2008) Global transcript profiles of fat in monozygotic twins discordant for BMI: pathways behind acquired obesity. *PLoS Med* **5**: e51
- Polderman KH, Gooren LJ, Asscheman H, Bakker A, Heine RJ (1994) Induction of insulin resistance by androgens and estrogens. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **79**: 265-271
- Pouliot MC, Despres JP, Lemieux S, Moorjani S, Bouchard C, Tremblay A, Nadeau A, Lupien PJ (1994) Waist circumference and abdominal sagittal diameter: best simple anthropometric indexes of abdominal visceral adipose tissue accumulation and related cardiovascular risk in men and women. *Am J Cardiol* **73**: 460-468
- Powis G, Montfort WR (2001) Properties and biological activities of thioredoxins. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* **30**: 421-455
- Qiao Q, Nyamdorj R (2010) Is the association of type II diabetes with waist circumference or waist-to-hip ratio stronger than that with body mass index? *Eur J Clin Nutr* **64**: 30-34
- Rabilloud T, Kieffer S, Procaccio V, Louwagie M, Courchesne PL, Patterson SD, Martinez P, Garin J, Lunardi J (1998) Two-dimensional electrophoresis of human placental mitochondria and protein identification by mass spectrometry: toward a human mitochondrial proteome. *Electrophoresis* **19**: 1006-1014
- Ramos-Fernandez A, Lopez-Ferrer D, Vazquez J (2007) Improved method for differential expression proteomics using trypsin-catalyzed ¹⁸O labeling with a correction for labeling efficiency. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **6**: 1274-1286
- Ranganathan PN, Lu Y, Jiang L, Kim C, Collins JF (2011) Serum ceruloplasmin protein expression and activity increases in iron-deficient rats and is further enhanced by higher dietary copper intake. *Blood* **118**: 3146-3153
- Regitz-Zagrosek V, Lehmkuhl E, Weickert MO (2006) Gender differences in the metabolic syndrome and their role for cardiovascular disease. *Clinical research in cardiology : official journal of the German Cardiac Society* **95**: 136-147
- Reyes J, Mariman E (2013) Application of proteomics technology in adipocyte biology. *Molecular bioSystems* **9**: 1076-1091
- Rodriguez A, Ezquerro S, Mendez-Gimenez L, Becerril S, Fruhbeck G (2015) Revisiting the adipocyte: a model for integration of cytokine signaling in the regulation of energy metabolism. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* **309**: E691-714
- Rodriguez A, Gomez-Ambrosi J, Catalan V, Gil MJ, Becerril S, Sainz N, Silva C, Salvador J, Colina I, Fruhbeck G (2009) Acylated and desacyl ghrelin stimulate lipid accumulation in human visceral adipocytes. *Int J Obes (Lond)* **33**: 541-552
- Romano AD, Greco E, Vendemiale G, Serviddio G (2014) Bioenergetics and mitochondrial dysfunction in aging: recent insights for a therapeutical approach. *Current pharmaceutical design* **20**: 2978-2992

- Rosen ED, Spiegelman BM (2014) What we talk about when we talk about fat. *Cell* **156**: 20-44
- Ross PL, Huang YN, Marchese JN, Williamson B, Parker K, Hattan S, Khainovski N, Pillai S, Dey S, Daniels S, Purkayastha S, Juhasz P, Martin S, Bartlett-Jones M, He F, Jacobson A, Pappin DJ (2004) Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **3**: 1154-1169
- Roth J, Vogl T, Sorg C, Sunderkotter C (2003) Phagocyte-specific S100 proteins: a novel group of proinflammatory molecules. *Trends Immunol* **24**: 155-158
- Russell SJ, Kahn CR (2007) Endocrine regulation of ageing. *Nature reviews Molecular cell biology* **8**: 681-691
- Salans LB, Knittle JL, Hirsch J (1968) The role of adipose cell size and adipose tissue insulin sensitivity in the carbohydrate intolerance of human obesity. *The Journal of clinical investigation* **47**: 153-165
- Salsbury FR, Jr., Knutson ST, Poole LB, Fetrow JS (2008) Functional site profiling and electrostatic analysis of cysteines modifiable to cysteine sulfenic acid. *Protein Sci* **17**: 299-312
- Sanchez-Caballero L, Guerrero-Castillo S, Nijtmans L (2016) Unraveling the complexity of mitochondrial complex I assembly: A dynamic process. *Biochimica et biophysica acta* **1857**: 980-990
- Saraste M (1999) Oxidative phosphorylation at the fin de siecle. *Science* **283**: 1488-1493
- Sartipy P, Loskutoff DJ (2003) Expression profiling identifies genes that continue to respond to insulin in adipocytes made insulin-resistant by treatment with tumor necrosis factor-alpha. *The Journal of biological chemistry* **278**: 52298-52306
- Schafer FQ, Buettner GR (2001) Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free radical biology & medicine* **30**: 1191-1212
- Schenk S, Saberi M, Olefsky JM (2008) Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *The Journal of clinical investigation* **118**: 2992-3002
- Schmidt BA, Horsley V (2013) Intradermal adipocytes mediate fibroblast recruitment during skin wound healing. *Development* **140**: 1517-1527
- Schmidt O, Pfanner N, Meisinger C (2010) Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms. *Nature reviews Molecular cell biology* **11**: 655-667
- Schmidt W, Poll-Jordan G, Loffler G (1990) Adipose conversion of 3T3-L1 cells in a serum-free culture system depends on epidermal growth factor, insulin-like growth factor I, corticosterone, and cyclic AMP. *The Journal of biological chemistry* **265**: 15489-15495
- Schwartz B, Yehuda-Shnaidman E (2014) Putative role of adipose tissue in growth and metabolism of colon cancer cells. *Frontiers in oncology* **4**: 164
- Seidell JC, Bjorntorp P, Sjostrom L, Kvist H, Sannerstedt R (1990) Visceral fat accumulation in men is positively associated with insulin, glucose, and C-peptide levels, but negatively with testosterone levels. *Metabolism* **39**: 897-901
- Semenkovich CF (1997) Regulation of fatty acid synthase (FAS). *Progress in lipid research* **36**: 43-53

- Shalev V, Chodick G, Heymann AD, Kokia E (2005) Gender differences in healthcare utilization and medical indicators among patients with diabetes. *Public health* **119**: 45-49
- Shimokata H, Tobin JD, Muller DC, Elahi D, Coon PJ, Andres R (1989) Studies in the distribution of body fat: I. Effects of age, sex, and obesity. *Journal of gerontology* **44**: M66-73
- Simpson ER (2003) Sources of estrogen and their importance. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* **86**: 225-230
- Skurk T, Alberti-Huber C, Herder C, Hauner H (2007) Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **92**: 1023-1033
- Smith AC, Robinson AJ (2016) MitoMiner v3.1, an update on the mitochondrial proteomics database. *Nucleic acids research* **44**: D1258-1261
- Snijder MB, Dekker JM, Visser M, Bouter LM, Stehouwer CD, Kostense PJ, Yudkin JS, Heine RJ, Nijpels G, Seidell JC (2003) Associations of hip and thigh circumferences independent of waist circumference with the incidence of type 2 diabetes: the Hoorn Study. *Am J Clin Nutr* **77**: 1192-1197
- Solon-Biet SM, Mitchell SJ, Coogan SC, Cogger VC, Gokarn R, McMahon AC, Raubenheimer D, de Cabo R, Simpson SJ, Le Couteur DG (2015) Dietary Protein to Carbohydrate Ratio and Caloric Restriction: Comparing Metabolic Outcomes in Mice. *Cell reports* **11**: 1529-1534
- Sommer F, Backhed F (2013) The gut microbiota--masters of host development and physiology. *Nature reviews Microbiology* **11**: 227-238
- Soro-Arnaiz I, Li QO, Torres-Capelli M, Melendez-Rodriguez F, Veiga S, Veys K, Sebastian D, Elorza A, Tello D, Hernansanz-Agustin P, Cogliati S, Moreno-Navarrete JM, Balsa E, Fuertes E, Romanos E, Martinez-Ruiz A, Enriquez JA, Fernandez-Real JM, Zorzano A, De Bock K, Aragonés J (2016) Role of Mitochondrial Complex IV in Age-Dependent Obesity. *Cell reports* **16**: 2991-3002
- Spor A, Koren O, Ley R (2011) Unravelling the effects of the environment and host genotype on the gut microbiome. *Nature reviews Microbiology* **9**: 279-290
- Sprinzak E, Cokus SJ, Yeates TO, Eisenberg D, Pellegrini M (2009) Detecting coordinated regulation of multi-protein complexes using logic analysis of gene expression. *BMC Syst Biol* **3**: 115
- Srinivasan S, Avadhani NG (2012) Cytochrome c oxidase dysfunction in oxidative stress. *Free radical biology & medicine* **53**: 1252-1263
- Stadtman ER (2006) Protein oxidation and aging. *Free Radic Res* **40**: 1250-1258
- Starkov AA (2008) The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1147**: 37-52
- Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, Lazar MA (2001) The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* **409**: 307-312
- Stern JS, Batchelor BR, Hollander N, Cohn CK, Hirsch J (1972) Adipose-cell size and immunoreactive insulin levels in obese and normal-weight adults. *Lancet* **2**: 948-951
- Stojanovski D, Bragoszewski P, Chacinska A (2012) The MIA pathway: a tight bond between protein transport and oxidative folding in mitochondria. *Biochimica et biophysica acta* **1823**: 1142-1150

- Stouthard JM, Romijn JA, Van der Poll T, Endert E, Klein S, Bakker PJ, Veenhof CH, Sauerwein HP (1995) Endocrinologic and metabolic effects of interleukin-6 in humans. *Am J Physiol* **268**: E813-819
- Strissel KJ, Stancheva Z, Miyoshi H, Perfield JW, 2nd, DeFuria J, Jick Z, Greenberg AS, Obin MS (2007) Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications. *Diabetes* **56**: 2910-2918
- Stroud DA, Surgenor EE, Formosa LE, Reljic B, Frazier AE, Dibley MG, Osellame LD, Stait T, Beilharz TH, Thorburn DR, Salim A, Ryan MT (2016) Accessory subunits are integral for assembly and function of human mitochondrial complex I. *Nature*
- Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW (2005) Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet* **365**: 1333-1346
- Sun K, Halberg N, Khan M, Magalang UJ, Scherer PE (2013) Selective inhibition of hypoxia-inducible factor 1alpha ameliorates adipose tissue dysfunction. *Molecular and cellular biology* **33**: 904-917
- Sun K, Kusminski CM, Scherer PE (2011) Adipose tissue remodeling and obesity. *The Journal of clinical investigation* **121**: 2094-2101
- Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta-Cepas J, Simonovic M, Roth A, Santos A, Tsafou KP, Kuhn M, Bork P, Jensen LJ, von Mering C (2015) STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic acids research* **43**: D447-452
- Szklarczyk R, Wanschers BF, Nabuurs SB, Nouws J, Nijtmans LG, Huynen MA (2011) NDUFB7 and NDUFA8 are located at the intermembrane surface of complex I. *FEBS Lett* **585**: 737-743
- Tang QQ, Lane MD (2012) Adipogenesis: from stem cell to adipocyte. *Annual review of biochemistry* **81**: 715-736
- Tang YH, Pang SM, Chan MF, Yeung GS, Yeung VT (2008) Health literacy, complication awareness, and diabetic control in patients with type 2 diabetes mellitus. *Journal of advanced nursing* **62**: 74-83
- Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR (2006) Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nature reviews Molecular cell biology* **7**: 85-96
- Taylor SW, Fahy E, Zhang B, Glenn GM, Warnock DE, Wiley S, Murphy AN, Gaucher SP, Capaldi RA, Gibson BW, Ghosh SS (2003) Characterization of the human heart mitochondrial proteome. *Nature biotechnology* **21**: 281-286
- Tchernof A, Belanger C, Morisset AS, Richard C, Mailloux J, Laberge P, Dupont P (2006) Regional differences in adipose tissue metabolism in women: minor effect of obesity and body fat distribution. *Diabetes* **55**: 1353-1360
- Tchernof A, Despres JP (2013) Pathophysiology of human visceral obesity: an update. *Physiological reviews* **93**: 359-404
- Tchkonia T, Tchoukalova YD, Giorgadze N, Pirtskhalava T, Karagiannides I, Forse RA, Koo A, Stevenson M, Chinnappan D, Cartwright A, Jensen MD, Kirkland JL (2005) Abundance of two human preadipocyte subtypes with distinct capacities for replication, adipogenesis, and apoptosis varies among fat depots. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* **288**: E267-277

- Thompson A, Schafer J, Kuhn K, Kienle S, Schwarz J, Schmidt G, Neumann T, Johnstone R, Mohammed AK, Hamon C (2003) Tandem mass tags: a novel quantification strategy for comparative analysis of complex protein mixtures by MS/MS. *Analytical chemistry* **75**: 1895-1904
- Tibblin G, Adlerberth A, Lindstedt G, Bjorntorp P (1996) The pituitary-gonadal axis and health in elderly men: a study of men born in 1913. *Diabetes* **45**: 1605-1609
- Tirosh A, de Souza RJ, Sacks F, Bray GA, Smith SR, LeBoff MS (2015) Sex Differences in the Effects of Weight Loss Diets on Bone Mineral Density and Body Composition: POUNDS LOST Trial. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **100**: 2463-2471
- Tormos KV, Anso E, Hamanaka RB, Eisenbart J, Joseph J, Kalyanaraman B, Chandel NS (2011) Mitochondrial complex III ROS regulate adipocyte differentiation. *Cell metabolism* **14**: 537-544
- Trasino SE, Tang XH, Jessurun J, Gudas LJ (2015) Obesity Leads to Tissue, but not Serum Vitamin A Deficiency. *Sci Rep* **5**: 15893
- Trayhurn P, Hoggard N, Mercer JG, Rayner DV (1999) Leptin: fundamental aspects. *Int J Obes Relat Metab Disord* **23 Suppl 1**: 22-28
- Tubbs E, Theurey P, Vial G, Bendridi N, Bravard A, Chauvin MA, Ji-Cao J, Zoulim F, Bartosch B, Ovize M, Vidal H, Rieusset J (2014) Mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane (MAM) integrity is required for insulin signaling and is implicated in hepatic insulin resistance. *Diabetes* **63**: 3279-3294
- Uhlen M, Fagerberg L, Hallstrom BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, Sivertsson A, Kampf C, Sjostedt E, Asplund A, Olsson I, Edlund K, Lundberg E, Navani S, Szigartyo CA, Odeberg J, Djureinovic D, Takanen JO, Hober S, Alm T, Edqvist PH, Berling H, Tegel H, Mulder J, Rockberg J, Nilsson P, Schwenk JM, Hamsten M, von Feilitzen K, Forsberg M, Persson L, Johansson F, Zwahlen M, von Heijne G, Nielsen J, Ponten F (2015) Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science* **347**: 1260419
- Ursini F, Maiorino M, Brigelius-Flohe R, Aumann KD, Roveri A, Schomburg D, Flohe L (1995) Diversity of glutathione peroxidases. *Methods Enzymol* **252**: 38-53
- Valle A, Catalan V, Rodriguez A, Rotellar F, Valenti V, Silva C, Salvador J, Fruhbeck G, Gomez-Ambrosi J, Roca P, Oliver J (2012) Identification of liver proteins altered by type 2 diabetes mellitus in obese subjects. *Liver Int* **32**: 951-961
- Van Harmelen V, Reynisdottir S, Eriksson P, Thorne A, Hoffstedt J, Lonqvist F, Arner P (1998) Leptin secretion from subcutaneous and visceral adipose tissue in women. *Diabetes* **47**: 913-917
- Vernochet C, Mourier A, Bezy O, Macotela Y, Boucher J, Rardin MJ, An D, Lee KY, Ilkayeva OR, Zingaretti CM, Emanuelli B, Smyth G, Cinti S, Newgard CB, Gibson BW, Larsson NG, Kahn CR (2012) Adipose-specific deletion of TFAM increases mitochondrial oxidation and protects mice against obesity and insulin resistance. *Cell metabolism* **16**: 765-776
- Vidal-Puig A (2013) Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the metabolic syndrome. *Endocrinologia y nutricion : organo de la Sociedad Espanola de Endocrinologia y Nutricion* **60 Suppl 1**: 39-43
- Villaca Chaves G, Pereira SE, Saboya CJ, Ramalho A (2008) Non-alcoholic fatty liver disease and its relationship with the nutritional status of vitamin A in individuals with class III obesity. *Obesity surgery* **18**: 378-385

- Villarroya J, Giralt M, Villarroya F (2009) Mitochondrial DNA: an up-and-coming actor in white adipose tissue pathophysiology. *Obesity (Silver Spring)* **17**: 1814-1820
- Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, Heglind M, Westergren R, Niemi T, Taittonen M, Laine J, Savisto NJ, Enerback S, Nuutila P (2009) Functional brown adipose tissue in healthy adults. *The New England journal of medicine* **360**: 1518-1525
- Virtue S, Vidal-Puig A (2010) Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome--an allostatic perspective. *Biochimica et biophysica acta* **1801**: 338-349
- Vogl T, Tenbrock K, Ludwig S, Leukert N, Ehrhardt C, van Zoelen MA, Nacken W, Foell D, van der Poll T, Sorg C, Roth J (2007) Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock. *Nature medicine* **13**: 1042-1049
- Wake DJ, Strand M, Rask E, Westerbacka J, Livingstone DE, Soderberg S, Andrew R, Yki-Jarvinen H, Olsson T, Walker BR (2007) Intra-adipose sex steroid metabolism and body fat distribution in idiopathic human obesity. *Clin Endocrinol (Oxf)* **66**: 440-446
- Walker GE, Marzullo P, Verti B, Guzzaloni G, Maestrini S, Zurleni F, Liuzzi A, Di Blasio AM (2008) Subcutaneous abdominal adipose tissue subcompartments: potential role in rosiglitazone effects. *Obesity (Silver Spring)* **16**: 1983-1991
- Wang C, Wheeler CT, Alberico T, Sun X, Seeberger J, Laslo M, Spangler E, Kern B, de Cabo R, Zou S (2013) The effect of resveratrol on lifespan depends on both gender and dietary nutrient composition in *Drosophila melanogaster*. *Age (Dordr)* **35**: 69-81
- Wang X, Hai C (2015) Redox modulation of adipocyte differentiation: hypothesis of "Redox Chain" and novel insights into intervention of adipogenesis and obesity. *Free radical biology & medicine* **89**: 99-125
- Washburn MP, Wolters D, Yates JR, 3rd (2001) Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nature biotechnology* **19**: 242-247
- Wei H, Persson S, Mehta T, Srinivasasainagendra V, Chen L, Page GP, Somerville C, Loraine A (2006) Transcriptional coordination of the metabolic network in Arabidopsis. *Plant physiology* **142**: 762-774
- Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW, Jr. (2003) Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *The Journal of clinical investigation* **112**: 1796-1808
- Welborn TA, Dhaliwal SS (2007) Preferred clinical measures of central obesity for predicting mortality. *Eur J Clin Nutr* **61**: 1373-1379
- Wernstedt Asterholm I, Tao C, Morley TS, Wang QA, Delgado-Lopez F, Wang ZV, Scherer PE (2014) Adipocyte inflammation is essential for healthy adipose tissue expansion and remodeling. *Cell metabolism* **20**: 103-118
- Westerterp-Plantenga MS, Lejeune MP, Smeets AJ, Luscombe-Marsh ND (2009) Sex differences in energy homeostatis following a diet relatively high in protein exchanged with carbohydrate, assessed in a respiration chamber in humans. *Physiol Behav* **97**: 414-419
- Wexler DJ, Grant RW, Meigs JB, Nathan DM, Cagliero E (2005) Sex disparities in treatment of cardiac risk factors in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* **28**: 514-520

- White SW, Zheng J, Zhang YM, Rock (2005) The structural biology of type II fatty acid biosynthesis. *Annual review of biochemistry* **74**: 791-831
- Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, Appel RD, Humphery-Smith I, Hochstrasser DF, Williams KL (1996) Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol Genet Eng Rev* **13**: 19-50
- Willett WC, Manson JE, Stampfer MJ, Colditz GA, Rosner B, Speizer FE, Hennekens CH (1995) Weight, weight change, and coronary heart disease in women. Risk within the 'normal' weight range. *JAMA : the journal of the American Medical Association* **273**: 461-465
- Winterbourn CC, Hampton MB (2008) Thiol chemistry and specificity in redox signaling. *Free radical biology & medicine* **45**: 549-561
- Wisniewski JR, Zougman A, Nagaraj N, Mann M (2009) Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nature methods* **6**: 359-362
- Woessner JF, Jr. (1991) Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **5**: 2145-2154
- Wortsman J, Matsuoka LY, Chen TC, Lu Z, Holick MF (2000) Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. *Am J Clin Nutr* **72**: 690-693
- Wronska A, Kmiec Z (2012) Structural and biochemical characteristics of various white adipose tissue depots. *Acta Physiol (Oxf)* **205**: 194-208
- Wu J, Bostrom P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang AH, Khandekar M, Virtanen KA, Nuutila P, Schaart G, Huang K, Tu H, van Marken Lichtenbelt WD, Hoeks J, Enerback S, Schrauwen P, Spiegelman BM (2012) Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* **150**: 366-376
- Xie X, Yi Z, Bowen B, Wolf C, Flynn CR, Sinha S, Mandarino LJ, Meyer C (2010) Characterization of the Human Adipocyte Proteome and Reproducibility of Protein Abundance by One-Dimensional Gel Electrophoresis and HPLC-ESI-MS/MS. *Journal of proteome research* **9**: 4521-4534
- Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA, Chen H (2003) Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *The Journal of clinical investigation* **112**: 1821-1830
- Xu H, Sethi JK, Hotamisligil GS (1999) Transmembrane tumor necrosis factor (TNF)-alpha inhibits adipocyte differentiation by selectively activating TNF receptor 1. *The Journal of biological chemistry* **274**: 26287-26295
- Yabluchanskiy A, Ma Y, Iyer RP, Hall ME, Lindsey ML (2013) Matrix metalloproteinase-9: Many shades of function in cardiovascular disease. *Physiology (Bethesda)* **28**: 391-403
- Yamakado M, Tanaka T, Nagao K, Ishizaka Y, Mitushima T, Tani M, Toda A, Toda E, Okada M, Miyano H, Yamamoto H (2012) Plasma amino acid profile is associated with visceral fat accumulation in obese Japanese subjects. *Clin Obes* **2**: 29-40

- Ye F, Zhang H, Yang YX, Hu HD, Sze SK, Meng W, Qian J, Ren H, Yang BL, Luo MY, Wu X, Zhu W, Cai WJ, Tong JB (2011) Comparative proteome analysis of 3T3-L1 adipocyte differentiation using iTRAQ-coupled 2D LC-MS/MS. *Journal of cellular biochemistry* **112**: 3002-3014
- Ye J (2011) Adipose tissue vascularization: its role in chronic inflammation. *Curr Diab Rep* **11**: 203-210
- Yin X, Lanza IR, Swain JM, Sarr MG, Nair KS, Jensen MD (2014) Adipocyte mitochondrial function is reduced in human obesity independent of fat cell size. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **99**: E209-216
- Young JC, Hoogenraad NJ, Hartl FU (2003) Molecular chaperones Hsp90 and Hsp70 deliver preproteins to the mitochondrial import receptor Tom70. *Cell* **112**: 41-50
- Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ (2002) Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free radical biology & medicine* **33**: 337-349
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* **372**: 425-432
- Zhao L, Zhang X, Shen Y, Fang X, Wang Y, Wang F (2015) Obesity and iron deficiency: a quantitative meta-analysis. *Obes Rev* **16**: 1081-1093
- Zhou H, Watts JD, Aebersold R (2001) A systematic approach to the analysis of protein phosphorylation. *Nature biotechnology* **19**: 375-378
- Zickermann V, Wirth C, Nasiri H, Siegmund K, Schwalbe H, Hunte C, Brandt U (2015) Structural biology. Mechanistic insight from the crystal structure of mitochondrial complex I. *Science* **347**: 44-49
- Zwadlo G, Bruggen J, Gerhards G, Schlegel R, Sorg C (1988) Two calcium-binding proteins associated with specific stages of myeloid cell differentiation are expressed by subsets of macrophages in inflammatory tissues. *Clin Exp Immunol* **72**: 510-515

anexo-I.

- tablas suplementarias -

A continuación se muestran los encabezados de las tablas suplementarias que acompañan a esta Tesis Doctoral. Debido a su tamaño, las tablas completas se encuentran en formato .xls y .xlsx en el CD adjunto.

Tabla S1 | Péptidos identificados en las muestras de VAT bajo FDR 1%. Se muestran las secuencias peptídicas identificadas para las distintas proteínas (descritas en formato FASTA) junto con el número correspondiente de espectros de fragmentación. **M***, oxidación de metionina (+ 15,9949 Da); **C@**, carbamidometilación de cisteína (+ 57,0215 Da); **K#**, marcaje iTRAQ 4-plex de lisina (+ 144,1021 Da). Tomada de (Gomez-Serrano et al, 2016).

Tabla S2 | Proteínas identificadas en las muestras de VAT. Se muestran los códigos de acceso de UniProt, la descripción en formato FASTA de las proteínas y los correspondientes nombres de los genes que las codifican (*N/A* se refiere a los genes no identificados, del inglés *Not Assigned*). Adicionalmente, se muestran el número de péptidos únicos y los espectros de fragmentación correspondientes. La FDR de identificación se fijó al 1%. Tomada de (Gomez-Serrano et al, 2016).

Tabla S3 | Análisis de enriquecimiento de las 2 525 proteínas identificadas en el proteoma del VAT. 'N' se refiere el número de proteínas identificadas que han sido asignadas a las correspondientes categorías. El porcentaje (%) representa la proporción de genes codificantes en los correspondientes GOBPs. La magnitud del enriquecimiento viene dada por el correspondiente *Fold enrichment* y el *p* valor indica el nivel de significación estadística. Solo se muestran aquellos GOBPs con $p < 0,05$. Las celdas coloreadas en azul señalan los GOBPs representados en la **Figura 14B**. Modificada de (Gomez-Serrano et al, 2016).

Tabla S4 | Proteínas del VAT cuantificadas bajo el modelo WSPP. Se muestran los códigos de acceso de UniProt, la descripción en formato FASTA de las proteínas y los valores estadísticos asociados. **X'q** se calcula como la media ponderada de los péptidos que cuantifican cada proteína corregida por el valor de la supermedia (que es la media ponderada de los valores para todas las proteínas). **Wq** se refiere al peso estadístico asociado a cada proteína, calculado a partir de los correspondientes pesos estadísticos de los péptidos y la varianza a nivel de proteína (el pesos estadístico es la inversa de la varianza). **Zq** es la variable estandarizada, que se define como el ratio logarítmico (en base 2) de la media X'q expresada en unidades de desviación estándar. **FDRq** muestra la tasa de error a nivel de proteína. **(1)** indica los datos procedentes de los marcajes iTRAQ 114 vs. 115 o que dan lugar al estudio diferencial de edad; **(2)** indica 116 vs. 114 o estudio diferencial de DM2; y **(3)** indica 116 vs. 117 o estudio diferencial de género. La variable Zq se acompaña de una escala de color donde el amarillo indicaría una mayor abundancia y el morado una menor abundancia en los grupos de obesas mayores de 45 años vs. menores de 35 años en el caso del estudio de edad; obesas diabéticas vs. no diabéticas en el caso del estudio de DM2; y mujeres diabéticas vs. hombres diabéticos en el caso del estudio de género. Modificado de (Gomez-Serrano et al, 2016). Para más información acerca del cálculo de las variables estadísticas puede consultarse la referencia del modelo WSPP (Navarro et al, 2014).

Tabla S5 | Análisis de enriquecimiento de las proteínas de tejido con mayor abundancia (n=67) encontradas exclusivamente en la comparación de edad. Se indican las bases de datos de las que parten las anotaciones de las distintas categorías funcionales. 'N' se refiere el número de DAPs que han sido asignadas a las correspondientes categorías. El porcentaje (%) representa la proporción de genes codificantes de las

correspondientes categorías funcionales. Se muestra el listado de DAPs para cada categoría mediante el código de acceso de UniProt. La magnitud del enriquecimiento viene dada por el correspondiente *Fold enrichment* y el *p* valor indica el nivel de significación estadística. Solo se muestran aquellas categorías con $p < 0,05$. En gris, se señalan aquellas categorías expuestas en la **Tabla 7**. Adaptada de (Gomez-Serrano et al, 2016).

Tabla S6 | Análisis de enriquecimiento de las proteínas de tejido con menor abundancia (n=88) encontradas exclusivamente en la comparación de edad. Se indican las bases de datos de las que parten las anotaciones de las distintas categorías funcionales. 'N' se refiere el número de DAPs que han sido asignadas a las correspondientes categorías. El porcentaje (%) representa la proporción de genes codificantes de las correspondientes categorías funcionales. Se muestra el listado de DAPs para cada categoría mediante el código de acceso de UniProt. La magnitud del enriquecimiento viene dada por el correspondiente *Fold enrichment* y el *p* valor indica el nivel de significación estadística. Solo se muestran aquellas categorías con $p < 0,05$. En gris, se señalan aquellas categorías expuestas en la **Tabla 7**. Adaptada de (Gomez-Serrano et al, 2016).

Tabla S7 | Análisis de enriquecimiento de las proteínas de tejido con mayor abundancia (n=41) encontradas exclusivamente en la comparación de DM2. Se indican las bases de datos de las que parten las anotaciones de las distintas categorías funcionales. 'N' se refiere el número de DAPs que han sido asignadas a las correspondientes categorías. El porcentaje (%) representa la proporción de genes codificantes de las correspondientes categorías funcionales. Se muestra el listado de DAPs para cada categoría mediante el código de acceso de UniProt. La magnitud del enriquecimiento viene dada por el correspondiente *Fold enrichment* y el *p* valor indica el nivel de significación estadística. Solo se muestran aquellas categorías con $p < 0,05$. En gris, se señalan aquellas categorías expuestas en la **Tabla 8**. Adaptada de (Gomez-Serrano et al, 2016).

Tabla S8 | Análisis de enriquecimiento de las proteínas de tejido con menor abundancia (n=52) encontradas exclusivamente en la comparación de DM2. Se indican las bases de datos de las que parten las anotaciones de las distintas categorías funcionales. 'N' se refiere el número de DAPs que han sido asignadas a las correspondientes categorías. El porcentaje (%) representa la proporción de genes codificantes de las correspondientes categorías funcionales. Se muestra el listado de DAPs para cada categoría mediante el código de acceso de UniProt. La magnitud del enriquecimiento viene dada por el correspondiente *Fold enrichment* y el *p* valor indica el nivel de significación estadística. Solo se muestran aquellas categorías con $p < 0,05$. En gris, se señalan aquellas categorías expuestas en la **Tabla 8**. Adaptada de (Gomez-Serrano et al, 2016).

Tabla S9 | Análisis de enriquecimiento de las proteínas de tejido con mayor abundancia (n=66) encontradas exclusivamente en la comparación de género. Se indican las bases de datos de las que parten las anotaciones de las distintas categorías funcionales. 'N' se refiere el número de DAPs que han sido asignadas a las correspondientes categorías. El porcentaje (%) representa la proporción de genes codificantes de las correspondientes categorías funcionales. Se muestra el listado de DAPs para cada categoría mediante el código de acceso de UniProt. La magnitud del enriquecimiento viene dada por el correspondiente *Fold enrichment* y el *p* valor indica el nivel de significación estadística. Solo se muestran aquellas categorías con $p < 0,05$. En gris, se señalan aquellas categorías expuestas en la **Tabla 9**. Adaptada de (Gomez-Serrano et al, 2016).

Tabla S10 | Análisis de enriquecimiento de las proteínas de tejido con menor abundancia (n=56) encontradas exclusivamente en la comparación de género. Se indican las bases de datos de las que parten las anotaciones

de las distintas categorías funcionales. 'N' se refiere el número de DAPs que han sido asignadas a las correspondientes categorías. El porcentaje (%) representa la proporción de genes codificantes de las correspondientes categorías funcionales. Se muestra el listado de DAPs para cada categoría mediante el código de acceso de UniProt. La magnitud del enriquecimiento viene dada por el correspondiente *Fold enrichment* y el *p* valor indica el nivel de significación estadística. Solo se muestran aquellas categorías con $p < 0,05$. En gris, se señalan aquellas categorías expuestas en la **Tabla 9**. Adaptada de (Gomez-Serrano et al, 2016).

Tabla S11 | Listado de proteínas de VAT coordinadamente moduladas en el estudio diferencial de edad. Se muestra el listado de proteínas para la categoría menos redundante de cada *cluster* mediante el código de acceso de UniProt y su símbolo. El valor Zq asociado aparece en una escala de color amarillo-morado (mayor o menor abundancia con la edad) donde puede observarse la progresión y dinámica del cambio. Las categorías señaladas en gris se corresponden a las curvas sigmoideas representadas en la **Figura 22B**.

Tabla S12 | Listado de proteínas de VAT coordinadamente moduladas en el estudio diferencial de DM2. Se muestra el listado de proteínas para la categoría menos redundante de cada *cluster* mediante el código de acceso de UniProt y su símbolo. El valor Zq asociado aparece en una escala de color amarillo-morado (mayor o menor abundancia asociada a DM2) donde puede observarse la progresión y dinámica del cambio. Las categorías señaladas en gris se corresponden a las curvas sigmoideas representadas en la **Figura 24B**.

Tabla S13 | Listado de proteínas de VAT coordinadamente moduladas en el estudio diferencial de género. Se muestra el listado de proteínas para la categoría menos redundante de cada *cluster* mediante el código de acceso de UniProt y su símbolo. El valor Zq asociado aparece en una escala de color amarillo-morado (mayor abundancia en mujeres u hombres, respectivamente) donde puede observarse la progresión y dinámica del cambio. Las categorías señaladas en gris se corresponden a las curvas sigmoideas representadas en la **Figura 28B**.

Tabla S14 | Péptidos identificados en las muestras de mitocondrias de adipocitos bajo FDR 1%. Se muestran las secuencias peptídicas identificadas para las distintas proteínas (descritas en formato FASTA) junto con el número correspondiente de espectros de fragmentación. También se indican los tipos de péptido identificados de acuerdo a sus modificaciones. **M#**, oxidación de metionina (+ 15,9949 Da); **C@**, carbamidometilación de cisteína (+ 57,0215 Da); **C***, modificación MMTS de cisteína (+ 45.9877 Da); **K⁺**, marcaje iTRAQ 4-plex de lisina (+ 144,1021 Da). **nonCys**, péptidos sin cisteínas; **redCys**, péptidos con cisteínas reducidas; **oxCys**, péptidos con cisteínas oxidadas; **redoxCys**, péptidos con cisteínas reducidas y oxidadas; **freeCys**, péptidos con cisteínas sin modificación. Tomada de (Gomez-Serrano et al, 2017).

Tabla S15 | Proteínas identificadas en las muestras mitocondrias de adipocitos. Se muestran los códigos de acceso de UniProt, la descripción en formato FASTA de la proteínas y los correspondientes nombres de los genes que las codifican (*N/A* se refiere a los genes no identificados, del inglés *Not Assigned*). Adicionalmente, se muestran el número de péptidos únicos y los espectros de fragmentación correspondientes. La FDR de identificación se fijó al 1%. Tomada de (Gomez-Serrano et al, 2017).

Tabla S16 | Análisis de enriquecimiento del proteoma mitocondrial de los adipocitos. El enriquecimiento se realizó con el listado de las 706 proteínas *bona fide* identificadas. 'N' se refiere el número de proteínas que han sido asignadas a las correspondientes categorías. El porcentaje (%) representa la proporción de genes codificantes en

las correspondientes categorías funcionales. La magnitud del enriquecimiento viene dada por el correspondiente *Fold enrichment* y el *p* valor indica el nivel de significación estadística. Solo se muestran aquellas categorías con $p < 0,05$. Las celdas coloreadas en naranja señalan los procesos biológicos representados en la **Figura 33B**.

Tabla S17 | Proteínas mitocondriales cuantificadas bajo el modelo WSPP. Se muestran los códigos de acceso de UniProt, la descripción en formato FASTA de las proteínas y los valores estadísticos asociados. $X^i q$ se calcula como la media ponderada de los péptidos que cuantifican cada proteína corregida por el valor de la supermedia (que es la media ponderada de los valores para todas las proteínas). Wq se refiere al peso estadístico asociado a cada proteína, calculado a partir de los correspondientes pesos estadísticos de los péptidos y la varianza a nivel de proteína (el pesos estadístico es la inversa de la varianza). Zq es la variable estandarizada, que se define como el ratio logarítmico (en base 2) de la media $X^i q$ expresada en unidades de desviación estándar. **FDRq** muestra la tasa de error a nivel de proteína. **(1)** indica los datos procedentes de los marcajes iTRAQ 116 vs. 117 o que dan lugar al estudio diferencial de edad y **(2)** indica 114 vs. 116 o estudio diferencial de DM2. La variable Zq se acompaña de una escala de color donde el amarillo indicaría una mayor abundancia y el morado una menor abundancia en los grupos de obesas mayores vs. menores en el caso del estudio de edad, y obesas diabéticas vs. no diabéticas en el caso del estudio de DM2. **nonCys**, péptidos que no contienen cisteínas y a partir de cuyos espectros de fragmentación se calculó la abundancia de las proteínas, de acuerdo al método descrito previamente (Martinez-Acedo et al, 2012). Tomada de (Gomez-Serrano et al, 2017).

Tabla S18 | Listado de proteínas mitocondriales moduladas coordinadamente en el estudio diferencial de edad. Se muestra el listado de proteínas para la categoría menos redundante de cada *cluster* mediante el código de acceso de UniProt y su símbolo. El valor Zq asociado aparece en una escala de color amarillo-morado (mayor o menor abundancia con la edad) donde puede observarse la progresión y dinámica de la respuesta. Las categorías se corresponden a las curvas sigmoideas representadas en la **Figura 35B**.

Tabla S19 | Listado de proteínas mitocondriales moduladas coordinadamente en el estudio diferencial de DM2. Se muestra el listado de proteínas para la categoría menos redundante de cada *cluster* mediante el código de acceso de UniProt y su símbolo. El valor Zq asociado aparece en una escala de color amarillo-morado (mayor o menor abundancia asociada a DM2) donde puede observarse la progresión y dinámica de la respuesta. Las categorías señaladas corresponden a las curvas sigmoideas representadas en la **Figura 37B**.

Tabla S20 | Análisis de enriquecimiento de la red de proteínas relacionadas con la Respuesta a los niveles de oxígeno desregulada en DM2. El conjunto de proteínas se sometió a un análisis de redes mediante la plataforma STRING (Szklarczyk et al, 2015). Diferentes categorías KEGG (Kanehisa et al, 2004) se enriquecieron significativamente a partir del interactoma (formado por proteínas validadas experimentalmente bajo un umbral de confianza del 0,95). Las celdas grises remarcan aquellas categorías citadas en el texto. Se muestran aquellas categorías con valores de $n \geq 5$ y $p < 0,01$.

Tabla S21 | Análisis de enriquecimiento de la red de proteínas relacionadas con la Cascada de señalización intracelular desregulada en DM2. El conjunto de proteínas se sometió a un análisis de redes mediante la plataforma STRING (Szklarczyk et al, 2015). Diferentes categorías KEGG (Kanehisa et al, 2004) se enriquecieron significativamente a partir del interactoma (formado por proteínas validadas experimentalmente bajo un umbral de

confianza del 0,95). Las celdas grises remarcan aquellas categorías citadas en el texto. Se muestran aquellas categorías con valores de $n \geq 5$ y $p < 0,01$.

Tabla S22 | Cuantificación de las modificaciones oxCys identificadas en las muestras de mitocondrias de adipocitos. Se muestran las secuencias peptídicas en las que se identificaron residuos oxidados de cisteínas (oxCys) y las proteínas a las que pertenecen. La posición de la modificación (residuo Cys) también se indica. Además del ratio de cambio a nivel de péptido, se indica también el ratio de cambio a nivel de la proteína a la que pertenecen. **Zp** es la variable estandarizada a nivel de péptido en términos de desviación estándar. **FDRp** muestra la tasa de error de cuantificación a nivel de péptido. **Zq** es la variable estandarizada a nivel de proteína en términos de desviación estándar. **(1)** indica los datos procedentes de los marcajes iTRAQ 116 vs. 117 o que dan lugar al estudio diferencial de edad y **(2)** indica 114 vs. 116 o estudio diferencial de DM2. La variable Zp se acompaña de una escala de color donde el rojo indicaría una mayor abundancia del péptido (mayor oxidación) y el azul una menor abundancia del péptido (menor oxidación) en las obesas mayores de 45 años vs. menores de 35 años en el caso del estudio de edad, y las obesas diabéticas vs. no diabéticas en el caso del estudio de DM2. La escala amarillo-morado indicaría la misma relación mayor-menor a nivel de abundancia de la proteína. **M#**, oxidación de metionina (+ 15,9949 Da); **C***, modificación MMTS de cisteína o residuo **oxCys** (+ 45.9877 Da); **K[^]**, marcaje iTRAQ 4-plex de lisina (+ 144,1021 Da). Modificada de (Gomez-Serrano et al, 2017).

Tabla S23 | Análisis de enriquecimiento de las proteínas oxCys identificadas en las muestras de mitocondrias de adipocitos. El enriquecimiento se realizó con las proteínas en las que se habían identificado residuos oxCys (n=116). '**N**' se refiere el número de proteínas que han sido asignadas a las correspondientes categorías. La magnitud del enriquecimiento viene dada por el correspondiente *Fold enrichment* y el *p* valor indica el nivel de significación estadística. Solo se muestran aquellas categorías con $p < 0,01$. Modificada de (Gomez-Serrano et al, 2017).

anexo-II.

- publicaciones -

El trabajo desarrollado durante esta Tesis Doctoral ha dado lugar a las siguientes publicaciones:

Directamente relacionadas

- **Gómez-Serrano M**, Camafeita E, López JA, Rubio MA, Bretón I, García-Consuegra I, García-Santos E, Lago J, Sánchez-Pernaute A, Torres A, Vázquez J, Peral B. *Differential proteomic and oxidative profiles unveil dysfunctional protein import to adipocyte mitochondria in obesity-associated aging and diabetes*. Redox Biol. **2017**; [11:415-428](#)
- **Gómez-Serrano M**, Camafeita E, García-Santos E, López JA, Rubio MA, Sánchez-Pernaute A, Torres A, Vázquez J, Peral B. *Proteome-wide alterations on adipose tissue from obese patients as age-, diabetes- and gender-specific hallmarks*. Sci Rep. **2016**; [6:25756](#)

No relacionadas

- Soto D, **Gómez-Serrano M**, Pieralisi A, Calvo JC, Peral B, Guerra LN. *N-acetylcysteine inhibits kinase phosphorylation during 3T3-L1 adipocyte differentiation*. Redox Rep. **2016**; [27:1-7](#)
- Roca-Rodríguez MM, El Bekay R, Garrido-Sanchez L, **Gómez-Serrano M**, Coin-Aragüez L, Oliva-Olivera W, Lhamyani S, Clemente-Postigo M, García-Santos E, de Luna Diaz R, Yubero-Serrano EM, Real JM, Peral B, Tinahones FJ. *Parathyroid Hormone-Related Protein, Human Adipose-Derived Stem Cells Adipogenic Capacity and Healthy Obesity*. J Clin Endocrinol Metab. **2015**; [100\(6\):E826-35](#)
- Malandrino MI, Fucho R, Weber M, Calderon-Dominguez M, Mir JF, Valcarcel L, Escoté X, **Gómez-Serrano M**, Peral B, Salvadó L, Fernández-Veledo S, Casals N, Vázquez-Carrera M, Villarroya F, Vendrell JJ, Serra D, Herrero L. *Enhanced fatty acid oxidation in adipocytes and macrophages reduces lipid-induced triglyceride accumulation and inflammation*. Am J Physiol Endocrinol Metab. **2015**; [308\(9\):E756-69](#)
- Ortega FJ, Serrano M, Rodriguez-Cuenca S, Moreno-Navarrete JM, **Gómez-Serrano M**, Sabater M, Rodriguez-Hermosa JI, Xifra G, Ricart W, Peral B, Vidal-Puig A, Fernández-Real JM. *Transducin-like enhancer of split 3 (TLE3) in adipose tissue is increased in situations characterized by decreased PPAR γ gene expression*. J Mol Med. **2015**; [93\(1\):83-92](#)
- Marino A, Menghini R, Fabrizi M, Casagrande V, Mavilio M, Stoehr R, Candi E, Mauriello A, Moreno-Navarrete JM, **Gómez-Serrano M**, Peral B, Melino G, Lauro R, Fernández-Real JM, Federici M. *ITCH deficiency protects from diet-induced obesity*. Diabetes. **2014**; [63\(2\):550-61](#)

- Calzadilla P, **Gómez-Serrano M**, García-Santos E, Schiappacasse A, Abalde Y, Calvo JC, Peral B, Guerra LN. *N-Acetylcysteine affects obesity-related protein expression in 3T3-L1 adipocytes*. Redox Report. **2013**; [18\(6\):210-8](#)
- Moreno-Navarrete JM, Ortega F, **Gómez-Serrano M**, García-Santos E, Ricart W, Tinahones F, Mingrone G, Peral B, Fernández-Real JM. *The MRC1/CD68 Ratio Is Positively Associated with Adipose Tissue Lipogenesis and with Muscle Mitochondrial Gene Expression in Humans*. PLoS One. **2013**; [8\(8\):e70810](#)