



# **Expresión del gen *FNDC5* tras la inducción de diabetes en ratas y tratamientos con leptina**

***FNDC5* gen expression after induction of diabetes in rats and treatment with leptin**

**Beatriz Vidal Bretal**

**Febrero, 2016**



**Expresión del gen *FNDC5* tras la inducción de diabetes en ratas y  
tratamientos con leptina**

***FNDC5* gen expression after induction of diabetes in rats and treatment  
with leptin**

Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña

Dra. Susana Sangiao Alvarellos en calidad de tutora del trabajo “Expresión del gen *FNDC5* tras la inducción de diabetes en ratas y tratamiento con leptina” autoriza a Beatriz Vidal Bretal su presentación ante el Tribunal Evaluador.

En A Coruña, a 1 de febrero de 2016

VºBº Tutor externo

Fdo.: Susana Sangiao Alvarellos

# ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>1. OBESIDAD .....</b>	<b>1</b>
<b>2. BALANCE ENERGÉTICO .....</b>	<b>1</b>
<b>3. REGULACIÓN DE LA INGESTA .....</b>	<b>2</b>
<b>3.1 Sistema de regulación a corto plazo.....</b>	<b>2</b>
<b>3.2 Sistema de regulación a largo plazo .....</b>	<b>3</b>
3.2.1 Páncreas.....	3
3.2.1.1 Insulina .....	3
3.2.2 Tejido adiposo.....	5
3.2.2.1 Leptina.....	5
3.2.2.2. Clasificación del tejido adiposo .....	7
<b>4. FNDC5/IRISINA.....</b>	<b>8</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>11</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>12</b>
<b>1. TÉCNICAS EXPERIMENTALES .....</b>	<b>12</b>
<b>1.1 Animales de experimentación.....</b>	<b>12</b>
1.1.1 Modelos animales.....	12
1.1.1.1 Modelo de ratas <i>Wistar</i> diabéticas .....	12
1.1.1.2. Tratamiento con leptina .....	14
<b>1.2 Extracción y localización de los tejidos extraídos .....</b>	<b>14</b>
<b>1.3 Experimentos con línea celular 3T3-L1 .....</b>	<b>15</b>
<b>1.4 Efecto de la irisina sobre la capacidad termogénica del tejido adiposo blanco.....</b>	<b>16</b>
<b>2. MÉTODOS ANALÍTICOS .....</b>	<b>17</b>
<b>2.1 Inmunoensayo enzimático (ELISA) para irisina.....</b>	<b>17</b>
<b>2.2 Estudios de expresión de ARNm: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR). .....</b>	<b>17</b>
2.2.1 Extracción ARN: Método del Trizol .....	17
2.2.2 Cuantificación y calidad del ARN .....	18
2.2.3 Tratamiento con DNasas.....	19
2.2.4 Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT) .....	19
2.2.5 qRT-PCR .....	19
<b>2.3 Análisis estadístico.....</b>	<b>20</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>21</b>
<b>1. BARRIDO DE LA EXPRESIÓN DE ARNm DE FNDC5 EN DISTINTOS TEJIDOS.....</b>	<b>21</b>
<b>2. CARACTERIZACIÓN DE MODELOS ANIMALES EN DIFERENTES SITUACIONES FISIOLÓGICAS.....</b>	<b>22</b>

2.1 Evolución peso corporal en ambos modelos. ....	22
2.2 Variación de los niveles de glucosa en el modelo de ratas diabéticas. ....	23
3. ESTUDIO DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE ARNm .....	24
3.1 Visualización integridad de las muestras.....	24
3.2 Expresión de ARNm de <i>FNDC5</i> en modelo de ratas diabéticas .....	24
3.3 Expresión de ARNm de <i>FNDC5</i> en modelo tratamiento con leptina .....	26
4. EFECTO DE LA IRISINA SOBRE LA CAPACIDAD TERMOGÉNICA DEL TAB. ....	27
5. CARACTERIZACIÓN DE LA PRESENCIA DE IRISINA EN SUERO DE ANIMALES BAJO DIFERENTES CONDICIONES FISIOLÓGICAS O PATOLÓGICAS.....	28
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>29</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>33</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>34</b>

## ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AG	Ácidos grasos
AGNE	Ácidos grasos no esterificados
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
DM2	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
DMEM/F-12	Medio de cultivo <i>Eagle</i> modificado por Dulbecco con poca glucosa
DS	Desviación estándar
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
<i>FNDC5</i>	Fibronectina tipo III con 5 dominios
IBMX	3- isobutil - 1 metilxantina
IP	Intraperitoneal
PGC-1 $\alpha$	Proteína 1 $\alpha$ coactivadora del receptor activado por el proliferador de peroxisomas
qRT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real
RI	Resistencia a la insulina
RL	Resistencia a la leptina
RT	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
SBF	Suero bovino fetal
SM	Síndrome metabólico
SNC	Sistema nervioso central
SOCS3	Supresor de la señalización de citoquinas 3
TAB	Tejido adiposo blanco
TABe	Tejido adiposo blanco epididimal
TABi	Tejido adiposo blanco inguinal

TABv	Tejido adiposo blanco visceral
TAP	Tejido adiposo pardo
TAS	Tejidoo adiposo blanco subcutáneo
TG	Triglicéridos
UCP-1	Proteína desacopladora tipo 1

## INTRODUCCIÓN

### 1. OBESIDAD

La obesidad es una enfermedad crónica multifactorial, resultado de la interacción entre factores de tipo genético-hereditarios y ambientales (alimentación, actividad física, etc.) (Marti *et al.*, 2008; FESNAD-SEEDO, 2011). Esta patología se define como una alteración metabólica, caracterizada por una acumulación excesiva de tejido adiposo, que aparece como consecuencia de un balance energético positivo mantenido en el tiempo (Seagle *et al.*, 2009).

En 2014 según datos de la OMS, alrededor del 13% de la población mundial adulta era obesa. Esta pandemia es directamente responsable del marcado incremento de la prevalencia mundial de diabetes tipo 2 (DM2) (Zachary *et al.*, 2000) y se asocia a enfermedades cardiovasculares (Kenchaiah *et al.*, 2002) y ciertos tipos de cáncer (Renehan *et al.*, 2008). Muchas de las comorbilidades de la obesidad son reflejadas en el conocido como síndrome metabólico (SM) que consiste en la asociación de un conjunto de alteraciones metabólicas y vasculares, entre las que destacan la resistencia insulínica (RI), la hipertensión arterial, la dislipemia, bajos niveles sanguíneos de lipoproteínas de alta densidad (HDL) y la obesidad abdominal (Luengo-Fernández *et al.*, 2005).

### 2. BALANCE ENERGÉTICO

La energía se obtiene exclusivamente a través del consumo de alimentos mientras que el gasto metabólico responde a diversos factores como el mantenimiento de la temperatura corporal, la homeostasis interna, la actividad física o los largos períodos de gestación y lactancia. Para que esta energía pueda estar disponible en el momento requerido, se ha desarrollado el tejido adiposo que mantiene y moviliza reservas de energía en forma de triglicéridos (TG). Este tejido se comporta con mucha plasticidad permitiendo un almacenamiento energético casi ilimitado entre los diversos depósitos localizados a lo largo del cuerpo (Wells, 2012).

Este balance se altera cuando de manera constante la ingesta calórica excede el gasto energético. Este exceso de energía se almacena como grasa corporal en los

adipocitos, que crecen y/o aumentan en número, provocando los problemas clínicos asociados con la obesidad, bien por el peso de la masa extra o bien por el aumento de secreción de ácidos grasos (AG) libres, péptidos y otras adipocinas (Álvarez-Castro *et al.*, 2011). Se produce entonces un desequilibrio atribuido a cambios en el control de la ingesta y el gasto energético, a la eficiencia en la utilización de la energía a través de modificaciones en la termogénesis, a la adipogénesis o a la combinación de todos ellos (Palou *et al.*, 2000).

El balance energético de una persona está regulado por distintos factores, entre los que destaca el sistema nervioso central (SNC), fundamentalmente a nivel del hipotálamo, a partir de señales neuroendocrinas centrales y periféricas que informan sobre las reservas energéticas y el estado nutricional (Luengo *et al.*, 2010). Todas ellas tienen efecto sobre el apetito, la saciedad, la frecuencia de ingesta, el tamaño de las porciones ingeridas, el proceso de asimilación de los alimentos por el tubo digestivo y el gasto energético (Badman *et al.*, 2005).

### **3. REGULACIÓN DE LA INGESTA**

Esta compleja regulación se lleva a cabo mediante sistemas orexigénicos, que promueven el apetito y el consumo de alimentos favoreciendo un balance energético positivo, mientras que por otro lado, están los sistemas anorexigénicos que promueven la saciedad limitando el consumo de alimentos y activando sistemas de consumo energético que favorecen un balance energético negativo (Redinger, 2009). En el control de la ingesta pueden diferenciarse dos sistemas de regulación, uno a corto plazo y otro a largo plazo.

#### **3.1 Sistema de regulación a corto plazo**

El sistema de regulación a corto plazo actúa modulando las señales de saciedad, que engloban toda una serie de estímulos mecánicos, químicos y hormonales (Badman *et al.*, 2005). El SNC recibe información sensorial, procedente de estímulos mecánicos que informan sobre el grado de distensión del tubo digestivo y la cantidad de alimento ingerido, y estímulos químicos, que aportan información sobre la composición nutricional del mismo.

### 3.2 Sistema de regulación a largo plazo

El sistema de regulación a largo plazo se basa en las señales de adiposidad, las cuales son proporcionales al tamaño de las reservas energéticas en forma de grasa. Estas señales interactúan con los circuitos neurales catabólicos y anabólicos, causando un cambio en la sensibilidad del cerebro a las señales de saciedad (Woods, 2005). Las principales señales implicadas en este proceso son sintetizadas por el páncreas (insulina) y el tejido adiposo (leptina) (Palou *et al.*, 2004), que son transportadas hasta sus respectivos receptores ubicados en el hipotálamo. Cuando la insulina y leptina se distribuyen de tal modo que aumentan su actividad en el cerebro, se consume menos comida, y cuando la acción de estas hormonas disminuye, la ingesta aumenta (Schwartz *et al.*, 2000).

#### 3.2.1 Páncreas

El páncreas es una glándula mixta compuesta por elementos de naturaleza exocrina (98%) y endocrina. La porción exocrina produce enzimas implicadas en la digestión, mientras que la parte endocrina está formada por una serie de cúmulos celulares, los islotes de Langerhans, conformados por tres tipos celulares distintos: células  $\alpha$  que expresan y secretan glucagón, células  $\beta$  secretoras de insulina y amilina y células  $\delta$  que secretan somatostatina (Cuenca, 2006).

##### 3.2.1.1 Insulina

La insulina es una hormona polipeptídica formada por 51 aminoácidos (aa), producida y secretada por las células  $\beta$  de los islotes de Langerhans del páncreas. Es la principal hormona anabólica y anticatabólica en el ser humano y se secreta inmediatamente tras la ingesta de alimentos en función de los niveles de nutrientes, especialmente glucosa y aa, de la activación del sistema parasimpático, así como de los niveles de las hormonas incretinas (Salehi *et al.*, 2006). Sus principales efectos metabólicos afectan al músculo, al tejido adiposo y al hígado (Zierath *et al.*, 2000).

En el músculo esquelético, la insulina estimula la captación de glucosa para la síntesis de glucógeno, la captación de aa para su incorporación a proteínas y la captación transcelular de ácidos grasos no esterificados (AGNE) estimulando la síntesis de TG. El tejido adiposo es un órgano de síntesis muy activo, en el que la insulina por un lado favorece la lipogénesis (síntesis de triglicéridos) y por otro lado, conduce a una disminución en la liberación de AGNE (Scherer *et al.*, 2011). La insulina también está involucrada en el mantenimiento de la homeostasis que asegura una oferta de sustratos energéticos a los tejidos más importantes.

En situaciones de obesidad y/o diabetes se presenta RI, que se define como un defecto en la acción de la insulina que provoca un aumento de la misma para mantener la glucemia en un rango normal (Alberti *et al.*, 2009). La RI conlleva la inhibición del efecto antilipolítico de la insulina en el tejido adiposo, lo que resulta en una disminución de los AG libres y su acumulación en diferentes tejidos (Savage *et al.*, 2007). Se cree que este defecto en el tejido adiposo aparece por la combinación de varios factores: la secreción elevada de adipopoquinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-6), los bajos niveles de adiponectina, las alteraciones que se producen a nivel de los receptores de insulina y las alteraciones en la expresión génica de los transportadores de glucosa insulino-sensibles. Esta situación favorece la lipólisis de los TG almacenados en el tejido adiposo y conlleva un aumento de la liberación de AG libres y de proteínas (Aranceta *et al.*, 2003). La saturación de la capacidad del tejido adiposo para almacenar AG libres, origina la migración de lípidos a tejidos periféricos como el músculo esquelético y cardíaco (Williams *et al.*, 2007), el hígado (Nakamura *et al.*, 2009) y las células  $\beta$  pancreáticas (Salgin *et al.*, 2012), donde se depositan y producen lipotoxicidad. Esta lipotoxicidad da lugar a RI en el músculo y el hígado porque los AG interfieren con la señal de insulina, los transportadores de glucosa y la captación de la misma, obstruyendo el metabolismo de la glucosa y produciendo intolerancia a la glucosa con hiperglucemia (Coker *et al.*, 2009). El páncreas segrega entonces más insulina y con el tiempo esta hiperactividad de las células  $\beta$  puede dar

lugar a una disfunción de las mismas, que junto al efecto lipotóxico de los AG libres y la consiguiente muerte de las células  $\beta$  derivará en DM2 (Wang *et al.*, 2011). Dado que con el tiempo, la RI además de en los adipocitos, se produce también en el tejido muscular esquelético, en el hígado y en el hipotálamo, el proceso se vuelve sistémico (Kopelman, 2000).

### 3.2.2 Tejido adiposo

El tejido adiposo ya no es considerado un tejido inerte que almacena grasa, sino que es un órgano metabólicamente dinámico donde además de almacenarse la energía de forma primaria, se sintetizan compuestos biológicamente activos como las hormonas, que regulan la homeostasis metabólica (Ottaviani *et al.*, 2011). Este tejido dinámico se compone principalmente de adipocitos, que le confieren la mayoría de sus propiedades y de forma secundaria de células sanguíneas, células endoteliales, fibroblastos, etc. (Ahima *et al.*, 2000; Saely *et al.*, 2012). Dependiendo de su ubicación, este tejido presenta diferente capacidad de secreción de adipocitoquinas y distinta cantidad de adipocitos, células sanguíneas y células del sistema inmune (Trzeciak-Ryczek *et al.*, 2011). El estudio del tejido adiposo como órgano endocrino se produjo tras la identificación de la leptina que producía obesidad y DM2 en ratones homocigotos deficientes para el gen de la leptina (*ob*) (Zhang *et al.*, 1994).

#### 3.2.2.1 Leptina

La leptina es una proteína de 167 aa producida sobre todo por el tejido adiposo blanco (TAB) aunque en cantidades menores también se produce en el tejido muscular esquelético, placenta y estómago (Strader *et al.*, 2005). Los niveles plasmáticos de esta adipoquina aumentan en proporción al número y tamaño de los adipocitos, siendo un fiel reflejo del *status* energético del individuo.

La leptina atraviesa la barrera hematoencefálica mediante un sistema saturable y es reconocida por las neuronas hipotalámicas y extrahipotalámicas, en especial las del núcleo arcuato hipotalámico (Tartaglia,

1997). La activación de sus receptores en esta área provoca una disminución en la ingesta y un aumento en el gasto energético (Yu *et al.*, 2012), por lo que se pensó que podría ser una buena candidata para disminuir el peso corporal. Tanto en humanos como en animales, se ha observado que con la administración de leptina se producía una disminución del peso corporal (Almanza-Pérez *et al.*, 2008). Sin embargo, en la gran mayoría de los casos de obesidad y en dietas altas en grasa se genera hiperleptinemia, provocando una obstrucción funcional de la hormona, que culmina en resistencia a la leptina (RL) lo que provoca una mayor ingesta y desarrollo de obesidad (Wang *et al.*, 2005).

La leptina también puede actuar como un modulador de la respuesta inmune (Hekerman *et al.*, 2007) ya que normalmente participa como citoquina antiinflamatoria, exhibiendo efectos directos sobre los monocitos y al incrementar la expresión y liberación de la citoquina antiinflamatoria IL-1 (Meier *et al.*, 2002). Sin embargo, cuando existe un estado de RL, actúa como una citoquina proinflamatoria generándose el estado inflamatorio crónico, característico de la diabetes y obesidad.

La interacción entre la leptina y la insulina ha sido ampliamente explorada debido principalmente a la coexistencia de estados de RI y RL en individuos obesos, así como a la asociación entre la obesidad y la diabetes. Se sabe que entre la leptina e insulina existe una perfecta homeostasis ya que se regulan mutuamente (Morioka *et al.*, 2007). Así, la leptina inhibe la producción de insulina en las células  $\beta$  del páncreas (Seufert, 2004), mientras que la insulina estimula la producción de leptina en el tejido adiposo. Sin embargo, en un estado de RL caracterizado por hiperleptinemia, se pierde la homeostasis entre estas moléculas, de tal manera que la leptina deja de inhibir la producción de insulina en el páncreas, conduciendo a una fase de hiperinsulinemia y resistencia a esta hormona. Este fenómeno de RL puede ser debido a fallos en la señalización o en su paso a través de la barrera hematoencefálica (Kershaw *et al.*, 2004) y está asociado, entre otras cosas, con elevados niveles del supresor de la señalización de citoquinas 3 (SOCS3)

(De Backer *et al.*, 2010). La leptina también juega un papel importante en el control de otras funciones fisiológicas como la reproducción, la angiogénesis, la remodelación ósea y la función cardiovascular.

#### 3.2.2.2. Clasificación del tejido adiposo

El tejido adiposo se puede clasificar en TAB, tejido adiposo pardo o marrón (TAP) y tejido adiposo beis.

TAB está ampliamente distribuido por todo el organismo (Moreno *et al.*, 2002; Pérez-Miguelsanz *et al.*, 2010), se considera el principal reservorio energético del organismo y posee toda la maquinaria necesaria para sintetizar AG, almacenar TG en periodos de abundancia energética y a movilizarlos en caso de déficit calórico (Harwood, 2012). Además sintetiza hormonas y moléculas bioactivas como la leptina y adiponectina. Este tipo de tejido adiposo aumenta notablemente en la obesidad debido a la hipertrofia e hiperplasia de los adipocitos (Palomer *et al.*, 2005).

En humanos, los adipocitos marrones son muy abundantes en recién nacidos, mientras que en adultos se ha descubierto recientemente su existencia, casi exclusiva en la zona cervical (Moreno *et al.*, 2002; Pérez-Miguelsanz *et al.*, 2010). Son los responsables de la termogénesis adaptativa o calor producido en respuesta a la exposición al frío (Klingenspor, 2003) o a una dieta hipercalórica (Lowell *et al.*, 2003). La termogénesis es regulada mayoritariamente por la estimulación del sistema nervioso simpático y constituye un componente importante en el gasto energético total. Los adipocitos del TAP presentan una gran cantidad de mitocondrias donde se lleva a cabo la fosforilación oxidativa que da lugar a la producción de calor (Cinti, 2005); estas mitocondrias presentan una maquinaria modificada que usa los AG almacenados para la generación de calor (termogénesis) mediante la activación de la proteína desacopladora tipo 1 (UCP-1) (Monckeberg, 2011).

Más recientemente se ha descrito un tercer tipo de adipocito que parece ser una transición entre el adipocito blanco y marrón que se denominó

adipocito beis (Seale *et al.*, 2008; Ishibashi *et al.*, 2010; Petrovic *et al.*, 2010). Tienen un color intermedio y unas propiedades termogénicas intermedias entre la grasa blanca y parda y se encuentra disperso a nivel subcutáneo próximo a la columna vertebral (Wu *et al.*, 2012). Para explicar el origen de estos adipocitos, se acuñó el término *browning* para referirse a un fenómeno que, en presencia de factores como el péptido fibronectina tipo III con 5 dominios (*FNDC5*)/irisina, permitiría a los adipocitos blancos del TAB llevar a cabo la termogénesis y la adquisición de características similares a las de los adipocitos marrones. También se comprobó que la inducción de este fenómeno de *browning* podría servir de protección frente a la diabetes y la obesidad inducida por la dieta (Wu *et al.*, 2012).

#### **4. FNDC5/IRISINA**

El mejor tratamiento para la obesidad es el cambio del estilo de vida, especialmente en la dieta y en la actividad física (Hawley *et al.*, 2014; Strasser, 2012). Recientemente se ha demostrado que durante o inmediatamente después de hacer ejercicio físico, el músculo esquelético pone en circulación varias mioquinas que pueden influir en la producción de citoquinas y en el metabolismo. El coactivador-1 $\alpha$  del receptor activado de proliferación de peroxisomas (PGC-1 $\alpha$ ) se expresa en el tejido muscular esquelético de manera diferencial, induciendo la biogénesis mitocondrial y la expresión de enzimas oxidativas en diferentes tipos celulares (Handschin *et al.*, 2008). Por esto, el músculo esquelético puede considerarse también un órgano endocrino (Pedersen *et al.*, 2007; Pedersen, 2012).

En enero de 2012, Boström y sus colaboradores demostraron que el tejido muscular desencadenaba un complejo proceso iniciado con un incremento de la expresión de PGC-1 $\alpha$ , que actuaba sobre diversos genes de los miocitos provocando un aumento en la expresión de una proteína de membrana denominada *FNDC5*, que por un posterior proceso de proteólisis daba lugar a una pequeña proteína que se liberaba al torrente circulatorio: la irisina (Boström *et al.*, 2012). Para ensayar los efectos de esta proteína *in vivo* el grupo de Spiegelman sobreexpresó *FNDC5* en el hígado de ratones de la cepa C57BL/6, concluyendo que el aumento de *FNDC5* circulante podría aumentar el

gasto energético, reducir el peso corporal y mejorar la RI inducida por la dieta (Boström *et al.*, 2012).

Estudios *in vitro*, demostraron que al añadir esta hormona a adipocitos de tejido adiposo blanco subcutáneo (TAS) durante las primeras etapas de su desarrollo, estos se transformaban en células beis incrementando su actividad termogénica (Moreno-Navarrete *et al.*, 2013; Hofman *et al.*, 2014). Las evidencias también sugieren una función antidiabética que mejora la homeostasis de la glucosa (Hojlund *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2013), una asociación inversa de la concentración de irisina con el contenido en grasa del hígado (Zhang *et al.*, 2013) y una correlación positiva con la folistatina, un péptido que regula el crecimiento muscular (Vamvini *et al.*, 2013). Se estudiaron ratones transgénicos que sobreexpresaban PGC-1 $\alpha$  en el músculo y se demostró la resistencia de estos animales a la diabetes y a la obesidad relacionada con la edad. El estudio se centró en los genes encargados de la termogénesis y en los implicados en el desarrollo del TAP, descubriendo que en el tejido adiposo subcutáneo (TABs) de estos ratones aparecían unos adipocitos marrones, que sobreexpresaban ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de UCP-1, propio del TAP. Este mismo resultado se observó al someter a ratones normales a distintos tipos de ejercicio durante 3 semanas. (Boström *et al.*, 2012).

Además de ser una mioquina, distintos experimentos con ratas demostraron que la irisina también es una adipoquina, puesto que se libera en el TAB. Se sugirió que la proporción de secreción de irisina por el tejido muscular/adiposo dependía de la situación fisiológica del individuo. El músculo sería el encargado en el ejercicio físico mientras que TAB sería el responsable de los niveles elevados de irisina en situaciones de IMC alterados como en la obesidad (Roca-Rivada *et al.*, 2013). Diversos experimentos también demostraron que la pérdida de peso tanto por restricción calórica como por cirugía bariátrica, disminuía los niveles circulantes de irisina y volvían a aumentar al recuperar su peso original (Crujeiras *et al.*, 2014).

Desde su descubrimiento, la función de la irisina ha sido muy controvertida llegando a cuestionarse incluso su existencia. Sin embargo, hace unos meses se demostró no sólo su existencia, gracias a la espectrometría de masas, sino también que sus niveles están en el rango de la actividad biológica (Jedrychowski *et al.*, 2015). Las diferencias

obtenidas en los niveles de esta hormona por distintos investigadores, podrían ser debidas tanto a los distintos métodos usados, como a la falta de eficacia de los ensayos por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) existentes. En relación a la función de la irisina, muchos investigadores apoyan un papel beneficioso de la misma en relación a la diabetes, obesidad, etc., mientras que otros apoyan un papel contrario (Chen *et al.*, 2015).

## OBJETIVOS

En un intento de esclarecer una relación entre la irisina y el *status* metabólico, se llevaron a cabo distintos experimentos de metabolismo alterado, en los que se analizaron los niveles de expresión de *FNDC5* en tejidos implicados en el metabolismo energético. Los objetivos concretos planteados fueron los siguientes:

1. Estudiar los niveles de expresión de *FNDC5* en distintos tejidos de rata.
2. Inducir diabetes tipo I a ratas macho adultas con la administración de alloxán.
3. Controlar los niveles de glucosa, con inyecciones de insulina, de parte de las ratas tratadas con alloxán.
4. Analizar los niveles de expresión de ARNm de *FNDC5* en TAB (visceral (TABv), inguinal (TABi) y epididimal (TABe)), TAP, músculo esquelético e hipotálamo de las ratas obtenidas en los puntos 1 y 2.
5. Administrar leptina de forma intraperitoneal (IP) a ratas macho adultas y analizar los niveles de expresión de ARNm de *FNDC5* en TAB (TABv, TABi y TABe), TAP, músculo esquelético e hipotálamo.
6. Comprobar la actividad termogénica de la irisina en la línea celular 3T3-L1 (preadipocitos).

## MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. TÉCNICAS EXPERIMENTALES

#### 1.1 Animales de experimentación

Los estudios se realizaron utilizando ratas macho *Rattus norvegicus* de la cepa *Wistar* (Figura 1), de 9 semanas de edad y un peso promedio de 200 g compradas a *Harlan Laboratories* (Barcelona). Los animales se mantuvieron en el animalario de la unidad de cirugía experimental del Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC), a una temperatura estable de 25°C y fotoperíodo de 12 horas de luz y 12 de oscuridad. Las ratas estuvieron en jaulas de macrolón (policarbonato), con comida y agua *ad libitum*.



**Figura 1.** Rata *Wistar*, cepa utilizada en este trabajo.

El experimento fue revisado y aprobado por los comités de bioética de la Universidad de Coruña (UDC) y el CHUAC de acuerdo con la Normativa de la Unión Europea para el uso de animales de experimentación.

##### 1.1.1 Modelos animales

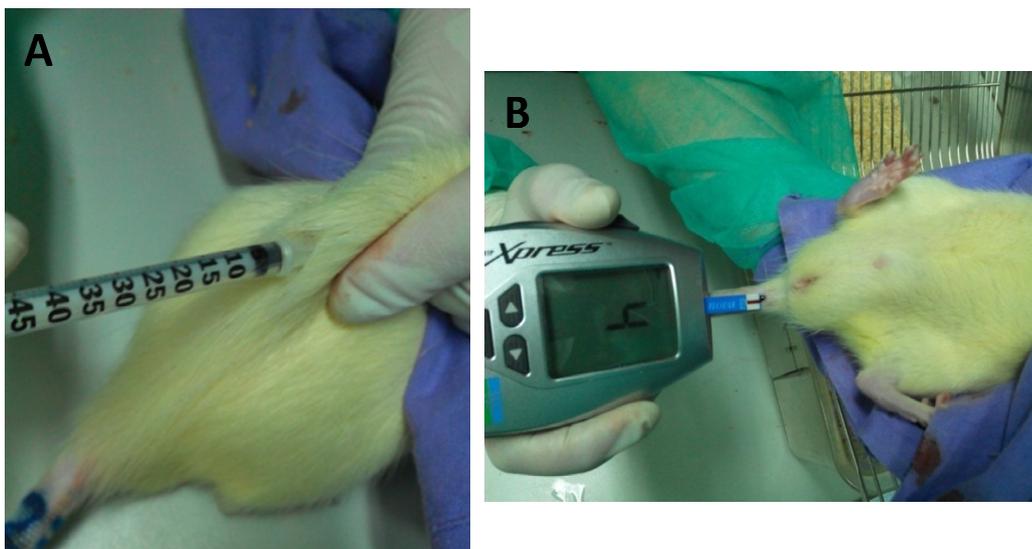
###### 1.1.1.1 Modelo de ratas *Wistar* diabéticas

En un intento de esclarecer si existe una relación entre la diabetes, los niveles de insulina/glucosa y la irisina, se indujo experimentalmente diabetes en un grupo de ratas normales y posteriormente se trataron con insulina parte de esos animales para normalizar sus niveles de glucosa en sangre.

Para inducir experimentalmente la diabetes, las ratas se trataron con alloxán (Sigma Aldrich) que destruye selectivamente las células  $\beta$  pancreáticas. Así se administraron (IP) (Figura 2) 130 mg de alloxán/kg de peso corporal a cada animal y al cabo de 10 días, cuando la diabetes estaba plenamente establecida, se dividieron en dos grupos: 9 ratas que continuaron sin tratamiento y 10 a las que se les administró insulina humana de acción prolongada (Insulatard Flexpen) según necesidad, mediante una inyección subcutánea (Figura 3A) para controlar los niveles de glucosa. La glucosa se midió en la vena caudal con un glucómetro *StatStrip Xpress* (Nova Biomedical) (Figura 3B). Durante el experimento se registraron diariamente los valores de ingesta, peso corporal y glucosa.



**Figura 2.** Lugar y forma de administrar las inyecciones IP de solución salina, alloxán y leptina.



**Figura 3.** Lugar y forma de administrar inyección subcutánea de insulina (A). Lugar y forma de medir los niveles de glucosa en la vena caudal (B).

Como grupo control se utilizaron 8 animales sin tratar con alloxán y que fueron inyectados IP con una solución salina isotónica (Fresenius Kabi), mientras el resto de los animales estaban siendo tratados con alloxán e insulina. De la misma manera, al grupo de ratas diabéticas sin tratamiento se les inyectó salino, cuando a las demás se les suministraba insulina.

### 1.1.1.2. Tratamiento con leptina

Se usó un modelo de ratas tratadas con leptina debido a la importancia de esta hormona en la regulación del balance energético y su implicación en el desarrollo de la obesidad. Para comprobar si la leptina ejerce algún efecto sobre los niveles de expresión de *FNDC5* y/o los niveles circulantes de irisina, 6 ratas fueron tratadas con inyecciones IP de salino, hasta que 14 h y 2 h antes del sacrificio, se les administró leptina de forma IP (ProSpec, 1 mg/kg de peso corporal) (Figura 2). Durante todo el experimento se registraron diariamente los valores de ingesta y peso corporal.

Como grupo control se utilizaron 8 animales de las mismas características y sometidos a las mismas condiciones, pero tratados exclusivamente con solución salina.

## 1.2 Extracción y localización de los tejidos extraídos

El experimento tuvo una duración total de 25 días y al término del estudio, las ratas fueron sacrificadas por decapitación. Se recogió sangre troncal, se analizaron los niveles de glucosa y se extrajeron cuidadosamente todos los tejidos para evitar posibles contaminaciones. La sangre se recogió en tubos BD Vacutainer® SST™ para suero con gel separador, se centrifugaron y se recogió el suero, que junto con los tejidos extraídos se guardó a -80°C hasta su uso.

Se extrajeron los siguientes tejidos:

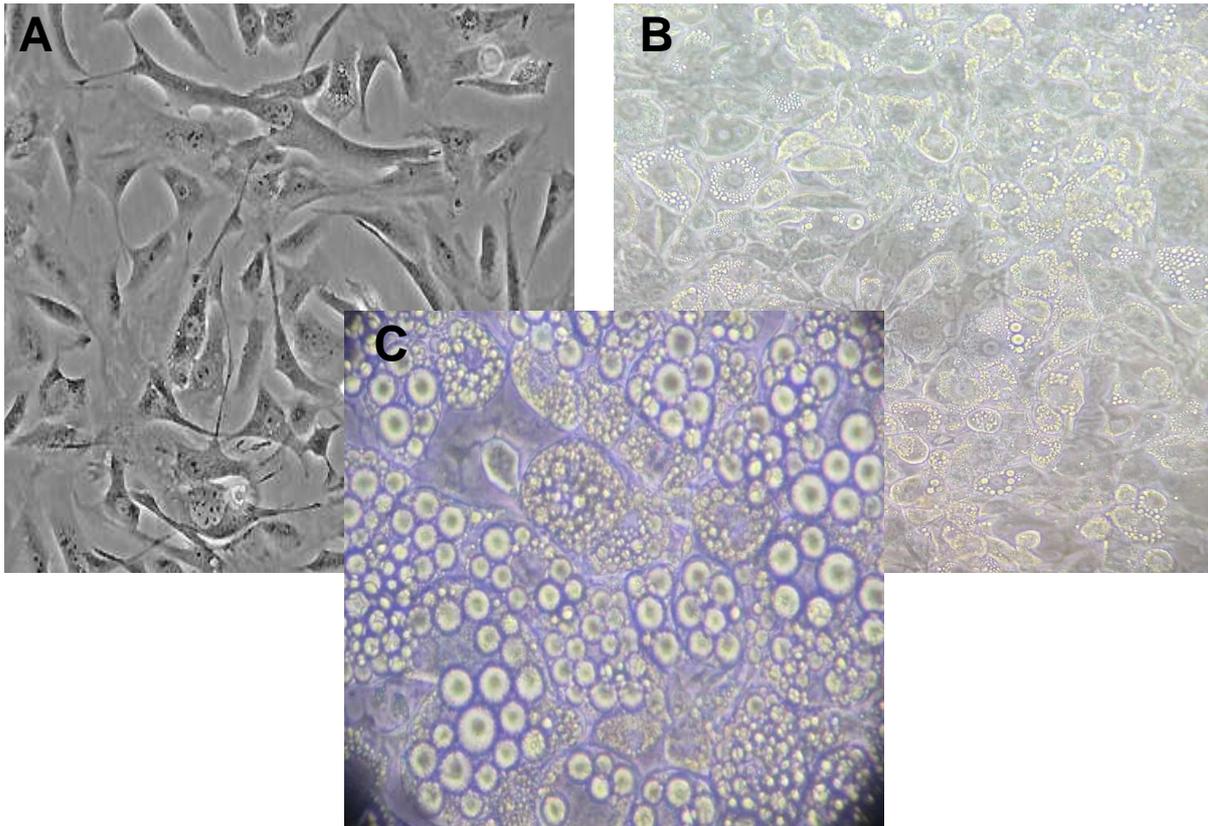
- Hipotálamo completo
- Tejido muscular esquelético, concretamente el gastrocnemio, situado en la pata del animal, con mayoría de fibras tipo II (glucolíticas rápidas).

- TAP que se extrajo de la región subcutánea del área supraclavicular.
- TAB que se recogió de tres localizaciones distintas: grasa blanca epididimal TABe asociada a los testículos y al epididimo, TABv localizada alrededor de las vísceras y TABi situada bajo la piel de las ingles.

### 1.3 Experimentos con línea celular 3T3-L1

Línea celular derivada de la establecida en 1962 (Todaro, 1963) y obtenida a partir de tejido embrionario de ratones de la cepa *Swiss*. Presenta una morfología tipo fibroblasto (Figura 4A) y pueden diferenciarse a adipocitos maduros en las condiciones adecuadas.

Las células se cultivaron en placas de cultivo p-100 (Nunclon) en 8 ml de medio de cultivo *Eagle* modificado por Dulbecco con poca glucosa (DMEM/F-12) (Gibco) suplementado con 10% suero bovino fetal (SBF), 100 u/ml de penicilina (Invitrogen) y 100 u/ml de estreptomicina (Invitrogen). Las células se levantaron con Tripsina (Sigma), se centrifugaron, se contaron con una cámara de Neubauer y se pusieron 50.000 células por pocillo. Se usaron dos placas multipocillo de 12 con 1,5 ml de medio y se incubaron hasta llegar a la confluencia. Para la diferenciación se siguió el protocolo descrito por Zebish (Zebish *et al.*, 2012). El medio de cultivo fue suplementado con 4,17 mg/ml de insulina, 1 mg/ml de dexametasona, 10 mg/ml de IBMX, 1 mg/ml de rosiglitazona, 10% SBF y 1% penicilina/estreptomicina (P/S) y se incubaron las células durante 48 h. Pasado este tiempo, durante los siguientes 7 días, el DMEM/F-12 fue suplementado con 4,17 mg/ml de insulina, y se cambió el medio cada dos días para así conseguir los adipocitos diferenciados (Figura 4B, 4C).



**Figura 4.** Línea celular 3T3-L1 utilizada para comprobar la capacidad termogénica de la irisina en TAB. Células en fase de crecimiento con morfología tipo fibroblasto (A). Adipocitos ya diferenciados (B). Detalle de la acumulación de lípidos en células 3T3-L1 (C).

#### **1.4 Efecto de la irisina sobre la capacidad termogénica del tejido adiposo blanco.**

Pasado este tiempo, se realizó un pequeño experimento para comprobar la capacidad de *browning* de la irisina usando dos marcas comerciales y dos concentraciones distintas. Para ello, los pocillos de estas placas se dividieron en varios grupos: un grupo control sin irisina, un segundo grupo al que se les añadió irisina 0,16 M (Phoenix), un tercero con irisina 0,16 M (Adipogen) y el cuarto grupo con el doble de concentración de irisina, 0,32 M (Adipogen).

## 2. MÉTODOS ANALÍTICOS

### 2.1 Inmunoensayo enzimático (ELISA) para irisina

El ELISA se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Así, mediante la adición de un sustrato específico la enzima producirá un color observable a simple vista y cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro o un colorímetro.

Los niveles circulantes de irisina se determinaron en el plasma sanguíneo de ratas utilizando para ello un kit comercial de ELISA (Irisin, Recombinant, Phoenix Pharmaceuticals, Inc.). Como paso previo se realizaron diluciones 1:1 y 1:5, ambas utilizando como diluyente el proporcionado por el kit.

El protocolo seguido fue el especificado por el fabricante. La cuantificación se realizó a 450 nm en un lector de placas *Sunrise* (Tecan) con el software de análisis Magellan.

### 2.2 Estudios de expresión de ARNm: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR).

Los puntos incluidos en este epígrafe se realizaron con cada uno de los tejidos extraídos de las 33 ratas y con las células.

#### 2.2.1 Extracción ARN: Método del Trizol

La extracción de ARN total se realizó mediante el uso de Trizol® *Reagent* (Invitrogen). Este reactivo combina fenol con isotiacinato de guanidina para inhibir inmediata y efectivamente la actividad ARNasa. Aproximadamente 0.1 g de tejido almacenado a -80°C se introdujo en un tubo con 1 ml de Trizol y dos bolas de circonio, para ser homogeneizado mecánicamente en el *Mixer Mil 200* (Retsch) durante 5-20 min (dependiendo de la dureza del tejido, por ej. hipotálamo=5min, músculo=20min).

Tras la homogeneización, las muestras de grasa y músculo se centrifugaron a 12000 g durante 5 minutos a 4°C para eliminar el exceso de grasa y posibles restos no homogenizados y se recogió el sobrenadante en un tubo limpio (este paso se omitió en el hipotálamo).

Se añadieron 200 µl de cloroformo por cada ml de Trizol, se agitó el tubo con ayuda del vórtex y se incubó a temperatura ambiente durante 2-3 minutos hasta ver bien dos capas diferenciadas (la fase inferior (orgánica) que contiene el ADN y restos de proteínas desnaturalizadas y la superior (acuosa) donde está el ARN).

Posteriormente se centrifugó a 12000 g durante 15 minutos a 4°C, se recogió el sobrenadante en otro tubo nuevo con cuidado de no tocar la interfase blanquecina (proteínas).

Se añadieron 500 µl de isopropanol por cada ml de Trizol y se incubó durante 30-60 min a -20°C. A continuación, se centrifugaron a 12000 g durante 10 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante por decantación con cuidado de no arrastrar el precipitado y posteriormente se añadió 1 ml de etanol al 75%. Se centrifugó a 7500 g durante 5 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante decantando el tubo sin arrastrar el precipitado. Una vez seco, se resuspendió el precipitado en 25-50 µl de H<sub>2</sub>O libre de ADNasas y ARNasas según el tamaño.

### 2.2.2 Cuantificación y calidad del ARN

El ARN extraído se analizó con un espectrofotómetro *Nanodrop-NA-1000* para conocer la concentración y pureza de cada muestra. De esta manera, posteriormente se pudieron diluir las muestras, para dejarlas a todas con la misma concentración de ARN.

Para conocer la integridad de las muestras se usó una electroforesis en gel de agarosa. El gel se realizó disolviendo 1-1,5 g de agarosa en 100 ml de TBE y añadiendo 10 µl de SyBR Safe. Tras su solidificación se añadió en cada pocillo 2 µl

ARN, 3  $\mu$ l tampón de carga 6x y 10  $\mu$ l de agua. Cuando se completó la electroforesis, el gel se expuso a luz UV en una cámara *LAS-3000* (Fujifilm).

### 2.2.3 Tratamiento con ADNAsas

Se realizó el tratamiento con ADNAsas para eliminar posibles contaminaciones con ADN genómico, siguiendo las instrucciones del comerciante. Para este tratamiento se preparó una mezcla con un 1 $\mu$ l de tampón, 1  $\mu$ l de ADNasa I y 8  $\mu$ l del ARN a una concentración conocida y se incubó en un termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems®) durante 40 minutos a 37°C.

Tras este tiempo se añadió 1  $\mu$ l del reactivo de inactivación de ADNAsas y se incubó 10 minutos a 65°C en un termobloque (Peqlab Biotechnologie GmbH).

### 2.2.4 Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT)

La RT es una reacción en la que la hebra de ARN es retrotranscrita en ADN complementario (ADNc) usando una enzima llamada transcriptasa inversa.

Se preparó una mezcla de 6  $\mu$ l de tampón de retrotranscripción 5x, 6  $\mu$ l de mezcla de dNTPs, 1,5  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub>, 0,17  $\mu$ l de Random Primer, 0,25  $\mu$ l de Rnasa out, 2  $\mu$ l de RTMMLV y 4,08  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O. Además de las 33 muestras, se incluyó una muestra de todos los ARNs (F1), para posteriormente realizar con ella una recta de eficiencia y dos controles negativos: RT- (blanco de retrotranscripción) y genómico- (blanco de genómico). A cada una de las 33 muestras se le añadieron 20  $\mu$ l de mezcla y 10  $\mu$ l de ARN (1 $\mu$ g), mientras que el RT- fue sin ARN y el genómico- sin la transcriptasa inversa.

Esto se colocó en el termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems®) con el programa: 95 minutos a 37°C/ 15 minutos a 42°C/ 5 minutos a 95°C y finalmente 4°C hasta la recogida de las muestras.

### 2.2.5 qRT-PCR

La qRT-PCR es una variante de la PCR convencional utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar el ADNc obtenido de la RT.

Se utilizaron placas de 96 pocillos y en cada uno de los pocillos se añadieron 2  $\mu$ l de ADNc y 15  $\mu$ l de una mezcla compuesta por 8,5  $\mu$ l de Master Mix (Roche), 0,136  $\mu$ l de cebadores y 6,4  $\mu$ l de agua.

Se selló la placa con un adhesivo óptico y se introdujo en un termociclador *Light cycler 480 II* (Roche). Se estudió la expresión del HPRT como gen control para usar de referencia y como gen de estudio se seleccionó *FNDC5*. Los valores de expresión relativa del gen de interés se calcularon en base al gen de referencia siguiendo el método de Pfaffl (Pfaffl, 2001).

### **2.3 Análisis estadístico**

En primer lugar se calcularon las medias y desviaciones estándar (DS) de cada grupo.

En todos los casos, el criterio para establecer la significación estadística fue de  $p < 0,05$  y se determinó por la prueba de la t-student (experimentos con dos grupos) y el test de análisis de la varianza (ANOVA) de una sola vía con el test de Tukey *post-hoc* (experimentos con más de dos grupos y una variable).

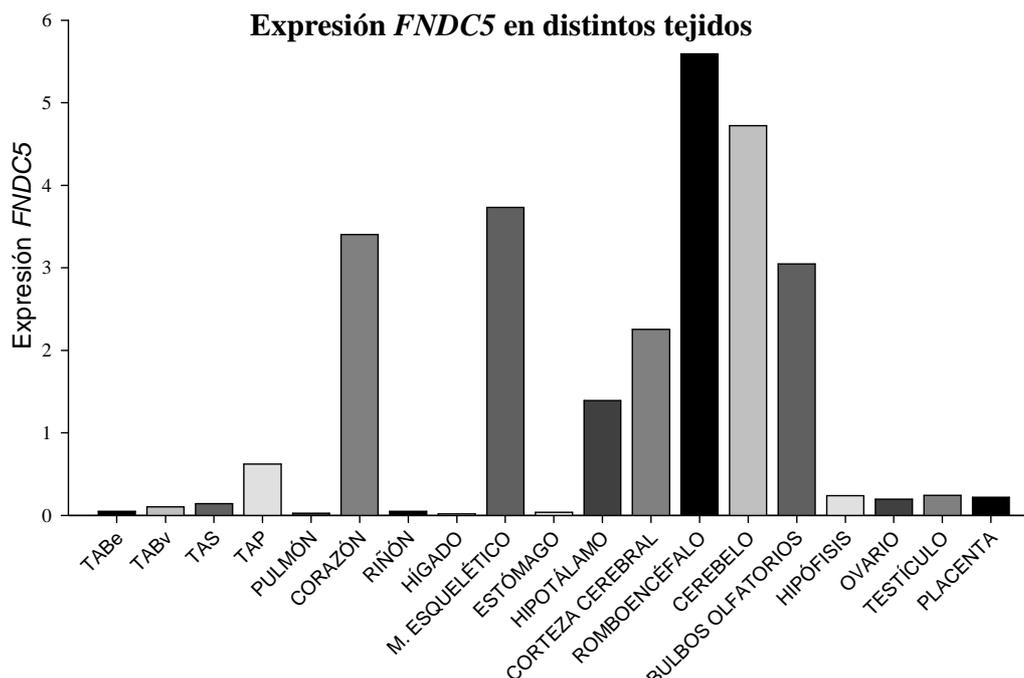
El análisis estadístico y las gráficas se crearon con el programa SigmaPlot versión 11.0 (Alemania).

## RESULTADOS

### 1. BARRIDO DE LA EXPRESIÓN DE ARNm DE *FNDC5* EN DISTINTOS TEJIDOS

Teniendo en cuenta que la función de *FNDC5*/irisina sigue siendo prácticamente desconocida y que hasta ahora ningún estudio describió en que tejidos se expresa esta proteína, se decidió realizar un barrido de la expresión del ARNm de *FNDC5* en distintos tejidos de rata adulta para ver si los resultados nos proporcionaban alguna información (Figura 5).

Los resultados obtenidos fueron muy interesantes puesto que demuestran que este gen se expresa a niveles muy altos en todas las áreas cerebrales analizadas, sugiriendo que tiene algún tipo de función a nivel central. Por otra parte, los niveles de expresión a nivel muscular también fueron muy altos tanto en músculo cardíaco como esquelético. Teniendo en cuenta los resultados observados en la Figura 5, este gen también podría estar implicado en el sistema reproductor, puesto que existen altos niveles de expresión en la hipófisis, ovarios, testículos y placenta, pero evidentemente son necesarios muchos más estudios para poder confirmar estos indicios. En el TAP también existe una expresión considerablemente alta de este gen, como cabría esperar si está implicado en el *browning* y se activa por PGC-1 $\alpha$  como sugieren estudios previos. Por último, aunque inferiores a los tejidos ya mencionados, los niveles de expresión génica de *FNDC5* también son altos en todos los depósitos de TAB estudiados, apuntando también una posible función en este tejido. En el resto de tejidos analizados la expresión del gen fue inexistente o residual.

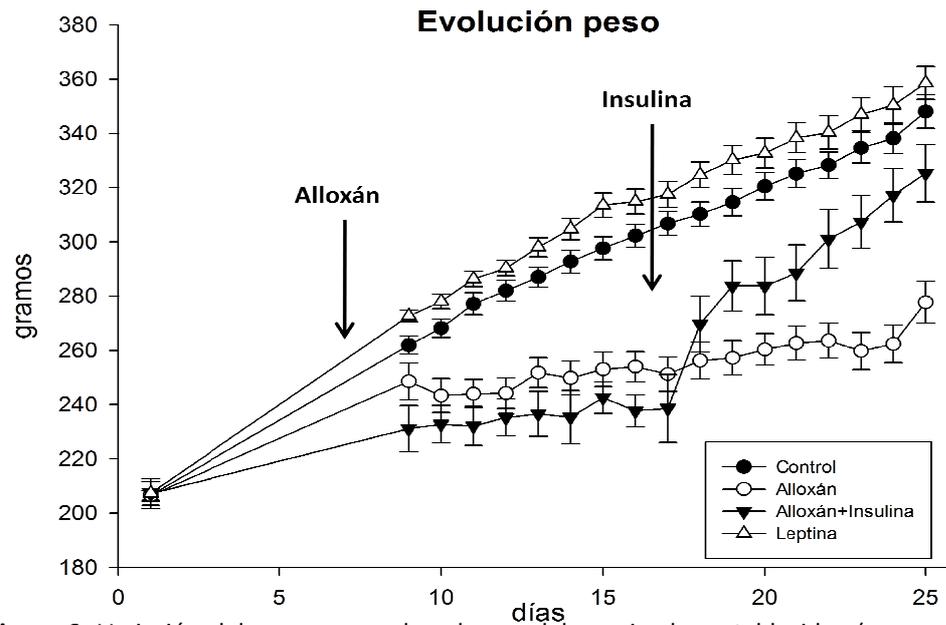


**Figura 5.** Perfil de expresión del gen *FNDC5* en diferentes tejidos de rata adulta. Se seleccionó un grupo de tejidos de ratas macho y hembra (ovario y placenta) para estudiar la expresión del ARNm de *FNDC5* usando qRT-PCR.

## 2. CARACTERIZACIÓN DE MODELOS ANIMALES EN DIFERENTES SITUACIONES FISIOLÓGICAS.

### 2.1 Evolución peso corporal en ambos modelos.

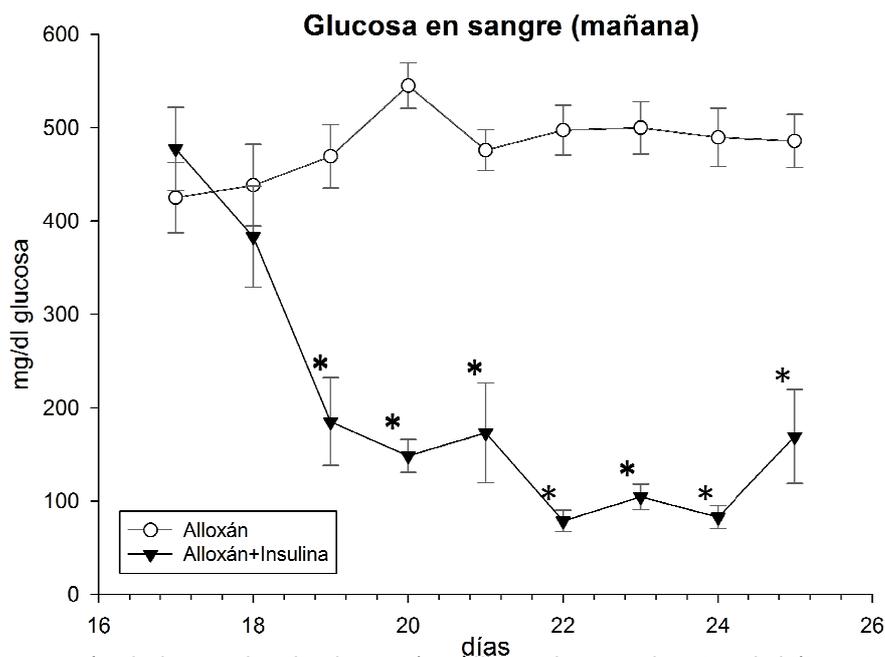
Durante los 25 días que duró el experimento, se controló el peso corporal de los animales (Figura 6). Se observó que el grupo control y el de leptina seguían un mismo patrón, aumentando una media de  $6 \pm 2$  gramos diarios. Se puede ver que tras la inyección IP de alloxán, las ratas diabéticas aumentaron muy poco de peso, pero una vez que se iniciaron los tratamientos con insulina, a partir del día 17, las ratas tratadas mostraron un incremento del peso corporal similar al grupo control, llegando a ser comparables los pesos al final del experimento.



**Figura 6.** Variación del peso corporal en los modelos animales establecidos (gramos). Los datos se presentan como la media  $\pm$  DS de cada grupo (Control= 8, Alloxán= 9, Alloxán+Insulina= 10 y Leptina= 6).

## 2.2 Variación de los niveles de glucosa en el modelo de ratas diabéticas.

Con el modelo de ratas Wistar diabéticas se comprobó la gran diferencia existente en los niveles de glucosa tras la administración de insulina (Figura 7). Las ratas diabéticas sin tratamiento mostraron unos valores muy elevados de glucosa, todas por encima de los 200 mg/ml, punto de corte que se estableció para considerarlas diabéticas, mientras que tras la administración de insulina estos bajaron rápidamente alcanzando valores de glucosa normales ( $90 \pm 20$  mg/dl) tras 8 días de tratamiento.

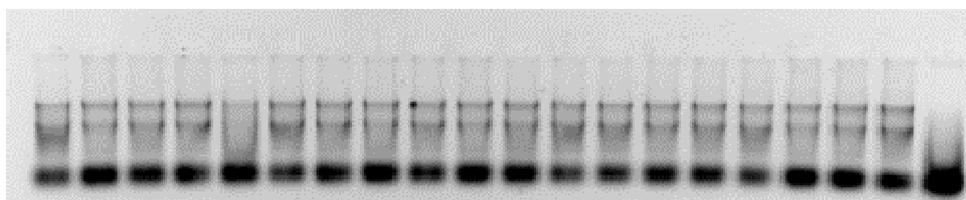


**Figura 7.** Variación de los niveles de glucosa (mg/dl) en el grupo de ratas diabéticas tratadas con insulina y ratas diabéticas sin tratar a partir del día 17 en el que se empieza a administrar insulina. Los datos se presentan como la media  $\pm$  DS de cada grupo (Alloxán= 9, Alloxán+insulina= 10). Las diferencias estadísticamente significativas se indican \* $p < 0,05$

### 3. ESTUDIO DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE ARNm

#### 3.1 Visualización integridad de las muestras

Tras la extracción y cuantificación del ARN se realizó una electroforesis en gel de agarosa para conocer la integridad de las muestras de rata en cada uno de los tejidos. Aquí presentamos una imagen representativa de los resultados obtenidos (Figura 8). Si en algún caso la integridad del ARN no era adecuada se repetía la extracción antes de proceder a la RT de las muestras (ej. último pocillo de esta imagen).

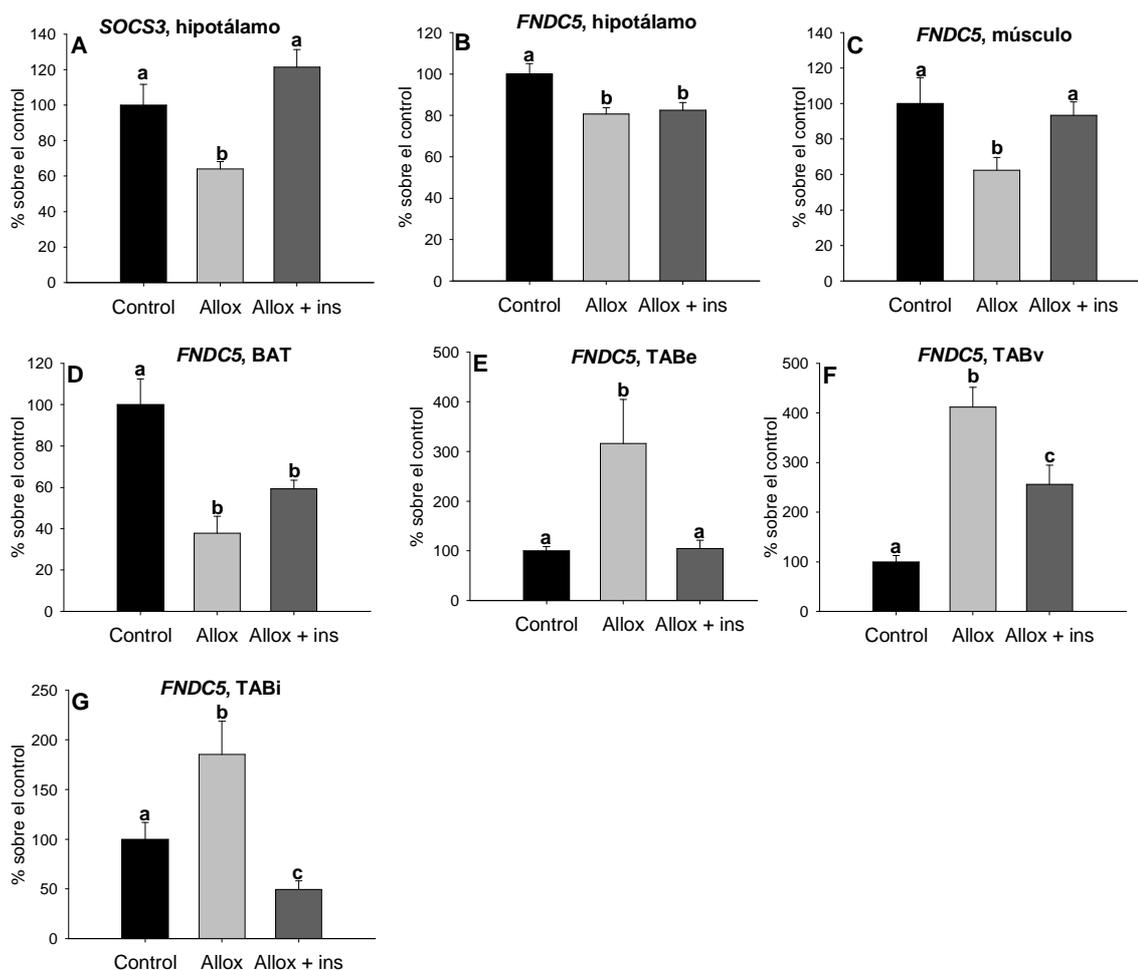


**Figura 8.** Gel de agarosa al 1,5% visualizado en una cámara LAS-3000 (Fujifilm) en el que se puede observar la integridad del ARN extraído.

#### 3.2 Expresión de ARNm de *FNDC5* en modelo de ratas diabéticas

Dada la relación de la diabetes con la obesidad y su elevada prevalencia, se utiliza un modelo de ratas diabéticas y sus correspondientes controles sanos. Este modelo constó de un grupo de ratas diabéticas sin tratamiento, otro de ratas diabéticas a las que se les inyectó insulina, para paliar en la medida de lo posible los efectos de la enfermedad y un tercer grupo control.

Los datos obtenidos mediante qRT-PCR (Figura 9) muestran diferencias estadísticamente significativas entre el control y el grupo diabético sin tratamiento en los niveles de ARNm de *SOCS3* hipotalámico, usado como control positivo en ratas diabéticas puesto que la administración de insulina aumenta los niveles de *SOCS3* en este tejido (Figura 9A) y de *FNDC5* en todos los tejidos analizados: hipotálamo (Figura 9B), músculo (Figura 9C), TAP (Figura 9D), TABe (Figura 9E), TABv (Figura 9F) y TABi (Figura 9G).



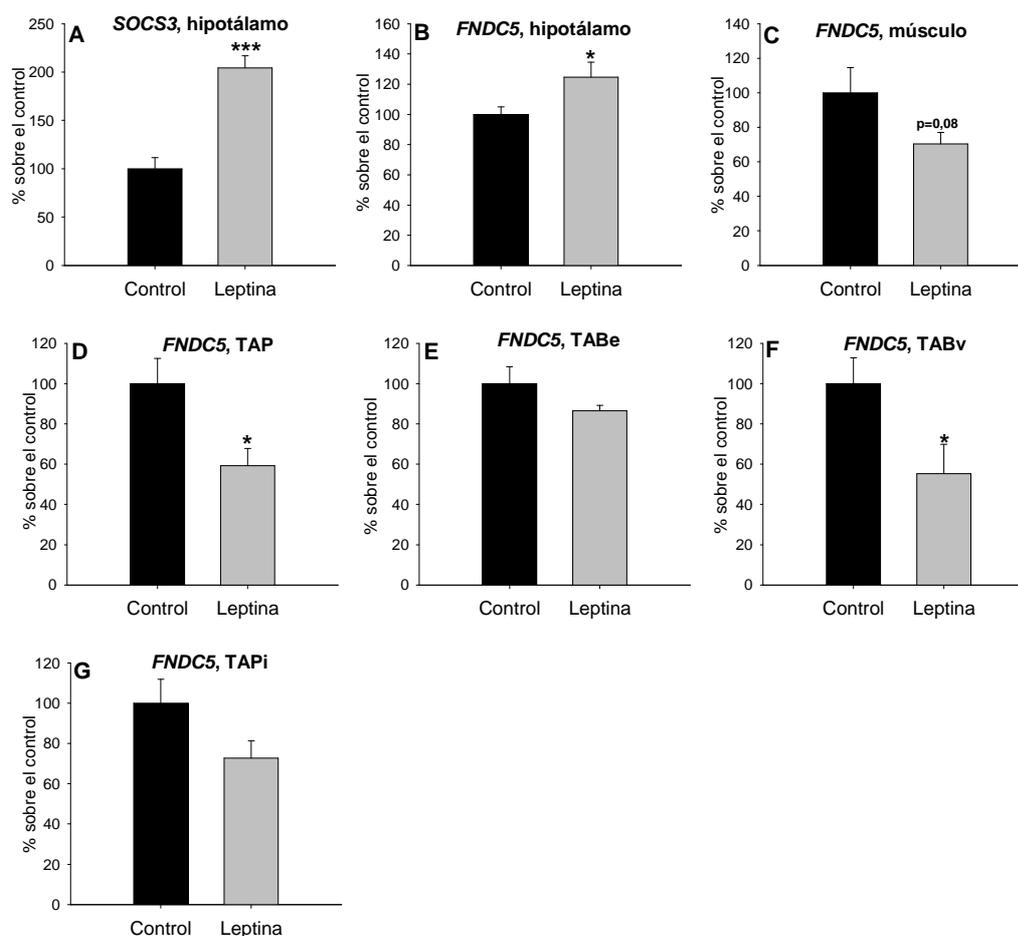
**Figura 9.** Niveles de expresión en modelo de diabetes de ARNm (% sobre el control) de *SOCS3* en hipotálamo (A) y *FNDC5* en hipotálamo (B), músculo (C), TAP (D), TABe (E), TABv (F) y TABi (G). Los datos obtenidos se presentan como la media  $\pm$  DS de cada grupo (control= 8, allox= 9, allox+ins= 10), donde el grupo control es el 100%. ANOVA de una vía con un test Tuckey *post hoc*. Diferentes letras sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

Se puede observar que la diabetes provocó un descenso de los niveles de expresión de ARNm de *SOCS3* hipotalámico (Figura 9A) y *FNDC5* en el músculo (Figura 9C) y TAP (Figura 9D), efecto revertido por el tratamiento con insulina. En cambio, en los tres depósitos de TAB estudiados (Figura 9E, 9F y 9G) el tratamiento con alloxán provocó un aumento de la expresión de ARNm de *FNDC5*, y aunque el tratamiento con insulina no siempre devolvió los valores a la normalidad (Figura 9F y 9G), si que se palió ese incremento.

### **3.3 Expresión de ARNm de *FNDC5* en modelo tratamiento con leptina**

En la Figura 10 se puede observar el impacto que tuvo el tratamiento con leptina en los niveles de ARNm de *FNDC5* respecto al control. La administración de leptina provocó un aumento estadísticamente significativo en los valores de ARNm hipotalámico para *SOCS3* (Figura 10A), lo que demuestra que el tratamiento con leptina funcionó correctamente. La relación de *SOCS3* con la leptina está ampliamente estudiada, se sabe que aumenta sus niveles, tanto a nivel de expresión génica como proteica, tras administraciones agudas o crónicas, es por ello que suele usarse como control positivo en tratamientos con leptina.

A nivel de *FNDC5* se puede observar que el tratamiento con leptina provocó efectos distintos a nivel central y periférico. Mientras que a nivel hipotalámico los niveles de ARNm aumentaron (Figura 10B) a nivel periférico disminuyeron tanto en músculo (Figura 10C), como en TAP (Figura 10D) y TAB (Figura 10E, 10F, 11G), si bien las diferencias no fueron siempre estadísticamente significativas.

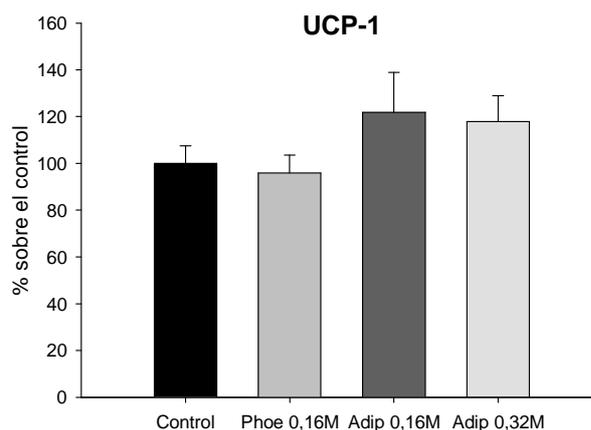


**Figura 10.** Niveles de expresión de ARNm (% sobre el control) tras tratamientos con leptina en los niveles de expresión de ARNm de *SOCS3* en hipotálamo (A) y *FNDC5* en hipotálamo (B), músculo (C), TAP (D), TABe (E), TABv (F) y TAPi (G). Los datos se presentan como la media  $\pm$  DS de cada uno (control=8, leptina=6), donde el grupo control es el 100%. t de student en el que las diferencias estadísticamente significativas se indican \*p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001.

#### 4. EFECTO DE LA IRISINA SOBRE LA CAPACIDAD TERMOGÉNICA DEL TAB.

Para estudiar la supuesta actividad termogénica de la irisina se trataron adipocitos maduros con irisina procedente de dos casas comerciales distintas y posteriormente se analizaron los niveles de ARNm de UCP-1 en estas células (Figura 11), puesto que es una proteína con alta expresión en el TAP pero no en el TAB.

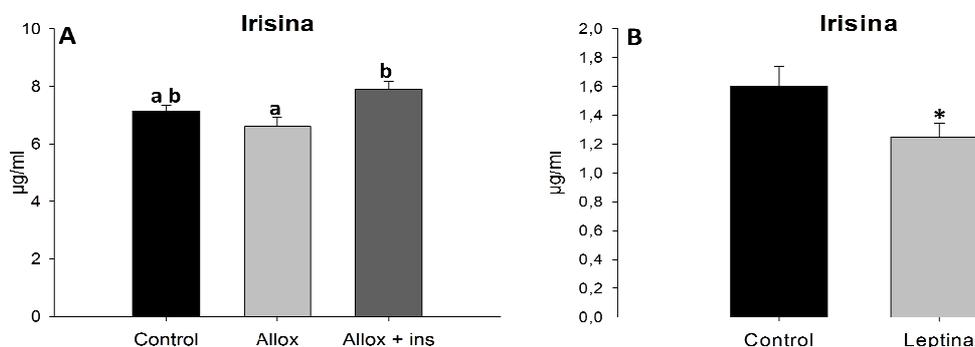
El análisis de estos resultados no mostró diferencias estadísticamente significativas entre las células control y las células tratadas con irisina independientemente de la dosis y la casa comercial utilizada, si bien sí se observó un ligero incremento en los valores de ARNm de UCP-1 en las células tratadas con irisina procedente de la casa comercial Adipogen.



**Figura 11.** Niveles de expresión de ARNm de UCP-1 (% sobre el control) en adipocitos maduros tras ser tratados con irisina de la casa comercial Phoenix y Adipogen durante 5 días. Los datos se presentan como la media  $\pm$  DS de cada grupo (control= sin irisina, Phoenix=0,16M, Adipogen= 0,16M y 0,32M), donde el grupo control es el 100%. ANOVA de una vía con un test Tuckey *post hoc*, un valor de  $p < 0,05$  se consideró estadísticamente significativo.

## 5. CARACTERIZACIÓN DE LA PRESENCIA DE IRISINA EN SUERO DE ANIMALES BAJO DIFERENTES CONDICIONES FISIOLÓGICAS O PATOLÓGICAS.

Los niveles de irisina circulante fueron evaluados mediante la técnica de ELISA en muestras de suero procedentes de los diferentes modelos animales previamente establecidos. En este estudio se observó que en las ratas diabéticas existe un pequeño descenso en los niveles de irisina circulante que no son estadísticamente significativos con respecto a los controles, pero sí con relación a las ratas diabéticas tratadas con insulina, datos que sugieren un efecto de la insulina sobre los niveles de irisina (Figura 12A). Por otra parte, el tratamiento con leptina provocó un descenso considerable en los niveles de irisina en sangre (Figura 12B).



**Figura 12.** Niveles circulantes de irisina en suero en el modelo de ratas diabéticas (A) y tras tratamientos con leptina (B). Los datos se presentan como la media  $\pm$  DS de cada grupo (control= 8, allox= 9, allox+ins= 10 y leptina= 6). ANOVA de una vía con un test Tuckey *post hoc* en el que diferentes letras sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas (A) y t de student (B) en el que las diferencias significativas se indican \* $p < 0,05$ .

## DISCUSIÓN

Además de su papel tradicional como depósito de energía, el TAB se considera actualmente un activo órgano endocrino que produce y secreta una gran cantidad de factores a la circulación, las adipoquinas, que participan en la regulación del metabolismo energético global del organismo (Adamczak *et al.*, 2013). De la misma forma, el tejido muscular esquelético, también ha adquirido el *status* de órgano endocrino, capaz de expresar y secretar las mioquinas relacionándolo, entre otras cosas, con la regulación de la homeostasis de la glucosa y su implicación en el desarrollo de la inflamación crónica sistémica propia de estados de obesidad. Diversos estudios aseguran la existencia de una comunicación directa entre estos tejidos, describiendo numerosas proteínas con función tanto de adipoquina como de mioquina (Argiles *et al.*, 2005; Trayhurn *et al.* 2011), que se consideran importantes para estudios futuros de las enfermedades endocrinas relacionadas con la obesidad o la inactividad física (Walsh, 2009; Turer *et al.*, 2012).

Boström y sus colaboradores demostraron que el tejido muscular desencadena un proceso que se inicia con un incremento de la expresión de PGC-1 $\alpha$ , que a su vez actúa sobre genes de las células musculares provocando un aumento en la expresión de una proteína denominada *FNDC5*, que por un posterior proceso de proteólisis, da lugar a una pequeña proteína que se libera al torrente circulatorio: la irisina, que puede actuar en el TAB activando la termogénesis (Boström *et al.*, 2012).

Bajo este contexto y dada la gran expectación generada a partir de la identificación de la *FNDC5*/irisina, en el presente trabajo se intentó caracterizar tanto los niveles circulantes de esta proteína como los niveles de ARNm de *FNDC5*, con el uso de modelos animales que emulan diferentes situaciones fisiológicas y metabólicas como la diabetes o el tratamiento con leptina.

Lo primero que llevamos a cabo fue un estudio de los niveles de expresión de ARNm de *FNDC5* en distintos tejidos de rata adulta, obteniendo los resultados de expresión más altos en todos los tejidos del SNC analizados, lo que sugiere que la irisina/*FNDC5* debe tener algún tipo de función en este sistema. Estos resultados se ven apoyados por el trabajo de Wrann y colaboradores, en el que demostraron que la ruta

PGC-1 $\alpha$ -*FNDC5*/irisina se activa por el ejercicio en el hipocampo de ratones y que esto provoca un programa génico neuroprotectivo, relacionando de este modo la irisina/*FNDC5* con la mejora cognitiva que se sabe que provoca el ejercicio (Wrann *et al.*, 2013).

También observamos niveles de expresión altos en todo el eje neuroendocrino relacionado con el sistema reproductor: hipotálamo, hipófisis, testículos, ovarios y placenta, sugiriendo una implicación de *FNDC5*/irisina en la reproducción, si bien hasta el momento los únicos datos disponibles son aquellos que relacionan los niveles de irisina en el cordón umbilical con la diabetes gestacional y el tamaño de los recién nacidos [Yuksel *et al.*, 2014; Baka *et al.*, 2015; Joung *et al.*, 2015]. Un tercer grupo de tejidos en los que observamos altos niveles de expresión de *FNDC5* son aquellos relacionados con el balance energético: músculo, TAP y TAB. En base a estos resultados y a estudios previos (Boström *et al.*, 2012; Roca-Rivada *et al.*, 2013), seleccionamos para este estudio los tejidos que muestran una expresión elevada de *FNDC5* y que además están relacionados con la regulación de la homeostasis energética y con la RI y la RL: el hipotálamo, por ser el centro regulador del balance energético (Morton, 2007) y órgano muy importante en las rutas de señalización de la insulina y la leptina (Yu *et al.*, 2012), el músculo esquelético (gastrocnemio), por ser uno de los encargados de secretar y expresar esta proteína y uno de los lugares donde la RI se hace más patente (Boström *et al.*, 2012; Handschin *et al.*, 2008;), el TAP por su función en la termogénesis adaptativa y el fenómeno del *browning* (Cinti, 2005), fenómeno que se describió que es capaz de llevar a cabo la irisina (Boström *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2012), y los tres depósitos de TAB, que también son muy importantes en la RI (Palomer *et al.*, 2005) y según estudios previos actúan como secretores de la irisina (Roca-Rivada *et al.*, 2013).

Tras la inducción de diabetes a las ratas, los niveles de expresión del ARNm de *FNDC5* disminuyeron en hipotálamo, músculo y TAP. Asimismo, también se observó un descenso en los niveles circulantes de irisina, aunque dicho descenso no llegó a ser significativo. Estos resultados coinciden con investigaciones anteriores que observaron niveles inferiores de irisina en pacientes con DM2 (Choi *et al.*, 2013; Moreno-Navarrete *et al.*, 2013). De manera contraria, en el TAB, independientemente de la localización del depósito, los valores de expresión de ARNm de *FNDC5* aumentan drásticamente en los

animales diabéticos respecto al control. Nuestros datos sugieren que los niveles de irisina en plasma son un balance entre lo que secreta el tejido muscular esquelético, que atendiendo a los niveles de expresión de *FNDC5* parece disminuir con la diabetes descontrolada, y lo que se secreta en el TAB, que parece aumentar por la ausencia de insulina. Además autores previos sugirieron que el TAB es el responsable de expresar la irisina en situaciones de metabolismo alterado (Roca-Rivada *et al.* 2013). Sin embargo, hay que tener en cuenta que aunque el TAB aumente mucho la secreción de *FNDC5*/irisina durante la diabetes tipo I, este estado provoca un descenso muy importante en la cantidad de depósitos grasos, algo claramente visible en nuestras ratas diabéticas no tratadas y que previamente habían observado otros autores (Crujeiras *et al.*, 2015). Trabajos previos encontraron descensos de los niveles de irisina en el suero con la diabetes mucho más acusados que los que nosotros observamos (Choi *et al.*, 2013). Esta falta de concordancia puede deberse a que los ELISA todavía no son lo suficientemente precisos para la detección de la irisina, tal como apuntaron estudios previos (Pardo *et al.*, 2014). De igual forma, con la destrucción de las células  $\beta$  del páncreas, no existe insulina en estos animales y se produce la RI propia de patologías endocrinas como la diabetes y obesidad. La expresión de ARNm de *FNDC5* se revierte tras el tratamiento con insulina en todos los tejidos, con la única excepción del hipotálamo, y también aumentan los niveles de irisina en plasma, volviendo a asemejarse a lo observado en los animales control. Estos resultados sugieren una correlación entre la insulina y la irisina y que los niveles de esta última corresponden a un balance entre lo secretado por el TAB y el músculo esquelético. Todos estos datos apuntan a un posible papel de la irisina en estados que implican alteraciones en la homeostasis de la glucosa, lo cual coincide con resultados de otros trabajos (Sesti *et al.*, 2014).

Trabajos anteriores han sugerido una posible relación entre irisina y leptina ya que sus respectivos niveles se encontraron asociados en humanos y ratas (Moreno-Navarrete *et al.*, 2013) y además la leptina aumenta la expresión de ARNm de PGC-1 $\alpha$  (Yasari *et al.*, 2009). Con la administración de leptina se observó un incremento de los niveles de expresión de ARNm de *FNDC5* en el hipotálamo, mientras que en el resto de tejidos analizados los niveles de expresión disminuyeron. En los niveles circulantes de irisina en suero, también se observó una disminución tras la administración de leptina. Estos datos

sugieren que tanto los niveles de expresión de ARNm de *FNDC5* como los niveles circulantes de irisina son modulados por la leptina, y que el efecto que esta hormona provoca a nivel central y periférico son opuestos.

También se analizó el posible efecto del *browning* sobre el TAB mediante la adición de irisina a adipocitos diferenciados en sus primeras etapas de desarrollo. Con esta prueba no se obtuvieron los resultados esperados, ya que no se pudo concluir un incremento estadísticamente significativo de la expresión de UCP-1 tras el tratamiento con irisina como se evidenciaba en otros trabajos (Boström *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2012). A pesar de que las dosis utilizadas eran equivalentes a esos estudios, estos resultados podrían deberse a que la irisina usada en este trabajo es comercial, mientras que en los trabajos antes mencionados es irisina recombinante sintetizada por ellos mismos. Tal vez con la irisina utilizada en este estudio necesitemos una mayor concentración para ver diferencias. Por lo tanto, no podemos descartar la implicación de la irisina en el fenómeno del *browning*, pero serían necesarios otros estudios con un rango de dosis más amplio y otros tiempos de exposición.

En conjunto nuestros resultados sugieren que la irisina/*FNDC5* tiene diferentes funciones a nivel central y periférico y que está regulada por hormonas como la insulina y la leptina. También muestran que los niveles de expresión de *FNDC5*/irisina van en concordancia con los valores encontrados de irisina circulante, teniendo en cuenta que estos últimos son un balance entre lo secretado por el músculo y el TAB según el estado metabólico. Sin embargo, son necesarios más estudios para demostrar las funciones concretas de la irisina y su forma de regulación.

## CONCLUSIONES

1. El barrido realizado en la expresión de *FNDC5* en distintos tejidos de rata sugiere que la irisina/*FNDC5* puede poseer funciones en el SNC, en los órganos relacionados con el sistema reproductor y en aquellos tejidos periféricos relacionados con el balance energético.
2. La administración de alloxán provocó diabetes tipo I en las ratas, induciendo valores de glucosa superiores a 200 mg/ml.
3. El tratamiento con insulina normalizó los valores de glucosa propios de la diabetes, devolviéndolos a su rango normal.
4. Tras la inducción de diabetes, los niveles de expresión de ARNm de *FNDC5* disminuyeron en hipotálamo, músculo y TAP y aumentaron en TAB apoyando la idea de que es el tejido responsable de producir *FNDC5*/irisina en situaciones de metabolismo alterado. De la misma forma, se encontró una correlación positiva entre la irisina y la insulina.
5. La leptina tiene efectos contrarios en los niveles de expresión de ARNm de *FNDC5* en el SNC y en los tejidos periféricos, observándose una correlación directamente proporcional entre los niveles de expresión de ARNm en los tejidos periféricos y la irisina circulante en las ratas tratadas, evidenciando que la leptina modula los niveles de irisina.
6. A las dosis utilizadas, la irisina comercial no parece estar implicada en la capacidad termogénica de los adipocitos maduros.

**BIBLIOGRAFÍA**

- Adamczak, M., Wiecek, A. (2013). The adipose tissue as an endocrine organ. *Semin Nephrol.* 33(1): 2-13
- Ahima, R.S., Flier, J. (2000). Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab.* 11: 327-332
- Alberti, K., Eckel, R., Grundy, S., Zimmet, P., Cleeman, J., Donato, K., Fruchart, J., James, W., Loria, C., Smith, S. (2009). Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart Lung and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society and International Association for the Study of Obesity. *Circulation.* 120(16): 1640-1645
- Almanza-Pérez, J., Blancas-Flores, G., García-Macedo, R., Alarcón-Aguilar, F.J., Cruz, M. (2008). Leptina y su relación con la obesidad y la diabetes mellitus tipo 2. *Gac Med Mex.* 144(6): 535-542
- Álvarez-Castro, P., Sangiao-Alvarellos, S., Brandón-Sandá, I., Cordido, F. (2011). Función endocrina en la obesidad. *Endocrinol Nutr.* 58(8): 422-432
- Aranceta, J., Foza, M., Gilc, B., Joverd, E., Mantilla, T., Millán, J., Monereo, S., Moreno, B. (2003). Documento de consenso: obesidad y riesgo cardiovascular. *Clint Invest Arterioscl.* 15(5): 196-233
- Argiles, J.M., López-Soriano, J., Almendro, V., Busquets, S., López-Soriano, F.J. (2005). Cross-talk between skeletal muscle and adipose tissue: a link with obesity? *Med Res Rev.* 25(1): 49-65
- Badman, M., Flier, J. (2005). The gut and energy balance: visceral allies in the obesity wars. *Science.* 307(5717): 1909-1914
- Baka, S., Malamitsi-Puchner, A., Boutsikou, T., Boutsikou, M., Marmarinos, A., Hassiakos, D., Gourgiotis, D., Briana, D.D. (2015). Cord blood irisin at the extremes of fetal growth. *Metabolism.* 64: 1515-1520
- Boström, P., Wu, J., Jedrychowski, M.P., Korde, A., Ye, L., Lo, J., Rasbach, K., Boström, E.A., Choi, J., Long, J., Kajimura, S., Zingaretti, M.C., Vind, B.F., Tu, H., Cinti, S., Hojlund, K., Gysi, S.P., Spiegelman, B.M. (2012). A PGC1-alpha-dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature.* 481(7382): 463-468
- Chen, N., Li, Q., Liu, J., Jia, S. (2015). Irisin an exercise-induced myokine as a metabolic regulator: an updated narrativa review. *Diabetes Metab Res Rev.* 32: 51-59
- Choi, Y.K., Kim, M.K., Bae, K.H., Seo, H.A., Jeong, J.Y., Lee, W.K., Kim, J.G., Lee, I.K., Park, K.G. (2013). Serum irisin levels in new-onset type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* 100(1): 96-101
- Cinti, S. (2005). The adipose organ. En: Fantuzzi, G., Mazzone, T. (Eds.). *Adipose tissue and adipokines in health and disease.* New York Heidelberg Dordrecht London: Humana Press, 3-19
- Coker, R.H., Williams, R.H., Yeo, S.E., Kortebein, P.M., Bodenner, D.L., Kern, P.A., Evan, W.J. (2009). Visceral fat and adiponectin: associations with insulin resistance are tissue-specific in women. *Metab Syndr Relat Disord.* 7(1): 61-67
- Cuenca, E.M. (2006). *Fundamentos de Fisiología.* Madrid: Paraninfo
- Crujeiras, A.B., Pardo, M., Roca-Rivada, A., Navas-Carretero, S., Zulet, M.A., Martínez, J.A., Casanueva, F. (2014). Longitudinal variation of circulating irisin after an energy restriction-induced weight loss and following weight regain in obese men and women. *Am J Hum Biol.* 26(2): 198-207
- De Backer, M.W., Brans, M.A., van Rozen, A.J., van der Zwaal, E.M., Luijendijk, M.C., Garner, K.G. (2010). Suppressor of cytokine signaling 3 knockdown in the mediobasal hypothalamus: counterintuitive effects on energy balance. *J Mol Endocrinol.* 45(5): 341-353

- FESNAD-SEEDO. (2011). Recomendaciones nutricionales basadas en la evidencia para la prevención y el tratamiento del sobrepeso y la obesidad en adultos. *Rev Esp Obes.* 1: 1-78
- Handschin, C., Spiegelman, B.M. (2008). The role of exercise and PGC1 $\alpha$  in inflammation and chronic disease. *Nature.* 454(7203): 463-469
- Harwood, H.J. Jr. (2012). The adipocyte as an endocrine organ in the regulation of metabolic homeostasis. *Neuropharmacology.* 63(1): 57-75
- Hawley, J.A., Hargreaves, M., Joyner, M.J., Zierath, J.R. (2014). Integrative biology of exercise. *Cell.* 159: 738–749
- Hekerman, P., Zeidler, J., Korfmacher, S., Bamberg-Lemper, S., Knobelspies, H., Zabeau, L., Tavernier, J., Becker, W. (2007). Leptin induces inflammation-related genes in RINm5F insulinoma cells. *BMC Mol Biol.* 23: 41
- Hofman, T., Elbelt, U., Stengel, A. (2014). Irisin as a muscle derived hormone stimulating thermogenesis. *Peptides.* 54: 89-100
- Hojlund, K., Boström P. (2012). Irisin in obesity and type 2 diabetes. *J Diabetes.* 27(4): 303-304
- Ishibashi, J., Seale, P. (2010). Beige can be slimming. *Science.* 328: 1113–1114
- Jedrychowski, M., Wrann, C., Paulo, J., Gerber, K., Szpyt, J., Robinson, M., Nair, K., Gygi, S., Spiegelman, B. (2015). Detection and Quantitation of Circulating Human Irisin by Tandem Mass Spectrometry. *Cell metabolism.* 22: 1-7
- Joung, K.E., Park, K.H., Filippaios, A., Dincer, F., Christou, H., Mantzoros, C.S. (2015). Cord blood irisin levels are positively correlated with birth weight in newborn infants. *Metabolism.* 64: 1507-1514
- Kenchaiah, S., Evans, J.C., Levy, D., Wilson, P.W., Benjamin, E.J., Larson, M.G., William, B., Kannel, M.D., Vasan, R.S. (2002). Obesity and the risk of heart failure. *N Engl J Med.* 347: 305-13
- Kershaw, E.E., Flier, J.S. (2004). Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab.* 89(6): 2548-2556
- Klingenspor, M. (2003). Cold-induced recruitment of brown adipose tissue thermogenesis. *Exp Physiol.* 88: 141-148
- Kopelman, P.G. (2000). Obesity as a medical problem. *Nature.* 404(6778): 635-643
- Lowell, B.B., Bachman, E.S. (2003). Beta-Adrenergic receptors, diet-induced thermogenesis, and obesity. *J Biol Chem.* 278: 29385-29388
- Luengo-Fernández, E., Ordoñez-Rubio, B., Bergua-Martínez, C. (2005). Obesidad, dislipemia y síndrome metabólico. *Rev Esp Cardiol.* 5(D): 21-29
- Luengo, L.M., Beato, P. (2010). Obesidad y sus complicaciones: resistencia insulínica y diabetes mellitus tipo 2. *Nutr Hosp Supl.* 3(1): 51-61
- Marti, A., Martinez-Gonzalez, M.A., Martinez, J.A. (2008). Interaction between genes and lifestyle factors on obesity. *Proc Nutr Soc.* 67(1): 1-8
- Meier, C.A., Bobbioni, E., Gabay, C., Assimakopoulos-Jeannet, F., Golay, A., Dayer, J.M. (2002). IL-1 receptor antagonist serum levels are increased in human obesity: A possible link to the resistance to leptin? *J Clin Endocrinol Metab.* 87: 1184-1188

- Monckeberg, F. (2011). Las complejas funciones del tejido graso. *Rev Chil Nutr.* 38: 1064-1072
- Moreno, M.J., Martínez, J.A. (2002). El tejido adiposo: órgano de almacenamiento y órgano secretor. *An Sist Sanit Navar.* 25(1): 29-39
- Moreno-Navarrete, J.M., Ortega, F., Serrano, M., Guerra, E., Pardo, G., Tinahones, F., Ricart, W., Fernández-Real, J.M. (2013). Irisin is expressed and produced by human muscle and adipose tissue in association with obesity and insulin resistance. *Clin Endocrinol Metab.* 98(4): E769-E778
- Morioka, T., Asilmaz, E., Hu, J., Dishinger, J.F., Kurpad, A.J., Elias, C.F., Li, H., Elmquist, J.K., Kennedy, R.T., Kulkarni, R.N. (2007). Disruption of leptin receptor expression in the pancreas directly affects a cell growth and function in mice. *J Clin Invest.* 117: 2860-2868
- Morton, G.J. (2007). Hypothalamic leptin regulation of energy homeostasis and glucose metabolism. *J Physiol.* 583: 437-443
- Nakamura, S., Takamura, T., Matsuzawa-Nagata, N., Takayama, H., Misu, H., Noda, H., Nabemoto, S., Kurita, S., Ota, T., Ando, H., Miyamoto, K., Kaneko, S. (2009). Palmitate induces insulin resistance in H4IIEC3 hepatocytes through reactive oxygen species produced by mitochondria. *J Biol Chem.* (22): 14809-14818
- Ottaviani, E., Malagoli, D., Franceschi, C. (2011). The evolution of the adipose tissue: a neglected enigma. *Gen Comp Endocrinol.* 174: 1-4
- Palomer, X., Pérez, A., Blanco-Vaca, F. (2005). Adiponectina: un nuevo nexo entre obesidad, resistencia a la insulina y enfermedad cardiovascular. *Med Clin (Barc).* 124(10): 388-395
- Palou, A., Serra, F., Bonet, M.L., Pico, C. (2000). Obesity: molecular bases of a multifactorial problem. *Eur J Nutr.* 39(4): 127-144
- Palou, A., Bonet, M.L., Pico, C., Rodríguez, A.M. (2004). Nutrigenómica y obesidad. *Rev Med Univ Navarra.* 48(2): 36-48
- Pardo, M., Crujeiras, A.B., Amil, M., Aguera, Z., Jimenez-Murcia, S., Baños, R., Botella, C., de la Torre, R., Estivill, X., Fagundo, A.B., Fernández-Real, J.M., Fernández-García, J.C., Frühbeck, G., Gómez-Ambrosi, J., Rodríguez, R., Tinahones, F.J., Fernández-Aranda, F., Casanueva, F.F. (2014). Association of irisin with fat mass, resting energy expenditure, and daily activity in conditions of extreme body mass index. *Int J Endocrinol.* 2014: 857270
- Pedersen, B. K., Akerstram, T.C., Nielsen, A.R., Fischer, C.P. (2007). Role of myokines in exercise and metabolism. *J Appl Physiol.* 103(3): 1093-1098
- Pedersen, B. K. (2012). A muscular twist on the fate of fat. *N Engl J Med.* 366(16): 1544-1545
- Pérez-Miguelsanz, M.J., Cabrera-Parra, W., Varela-Moreiras, G., Garaulet, M. (2010). Distribución regional de la grasa corporal: uso de técnicas de imagen como herramienta de diagnóstico nutricional. *Nutr Hosp.* 25(2): 207-223
- Petrovic, N., Walden, T.B., Shabalina, I.G., Timmons, J.A., Cannon, B., Nedergaard, J. (2010). Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARGgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1 containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *J Biol Chem.* 285: 7153-7164
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29(9): e45
- Redinger, R.N. (2009). Fat storage and the biology of energy expenditure. *Transl Res.* 154(2): 52-60

- Renehan, A.G., Tyson, M., Egger, M., Heller, R.F., Zwahlen, M. (2008). Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet*. 371: 569-578
- Roca-Rivada, A., Castela, C., Senin, L.L., Landrove, M.O., Baltar, J., Crujeiras, A.B., Seoane, L.M., Casanueva, F.F., Pardo, M. (2013). FNDC5/irisin is not only a myokine but also an adipokine. *PLoS ONE*. 8(4): 60563.
- Saely, C., Geiger, K., Drexel, H. (2012). Browns versus white adipose tissue: a minireview. *Gerontol*. 58: 120-122
- Salehi, M., D'Alessio, D.A. (2006). New therapies for type 2 diabetes base don glucagon-like peptide-1. *Clev Clin J Med*. 73: 382-389
- Salgin, B., Ong, K.K., Thankamany, A., Emmett, P., Wareham, N.J., Dunger, A.B. (2012). Higher fasting plasma free fatty acid levels are associated with lower insulin secretion in children and adults and a higher incidence of type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 97(9): 3302-3309
- Savage, D.B., Petersen, K.F., Shulman, G.I. (2007). Disordered lipid metabolism and the pathogenesis of insulin resistance. *Physiol Rev*. 87(2): 507-520
- Scherer, T., O'Hare, J., Diggs-Andrews, K., Schweiger, M., Cheng, B., Lindtner, C., Zielinski, E., Vempati, P., Su, K., Dighe, S., Milsom, T., Puchowicz, M., Scheja, L., Zechner, R., Fisher, S.J., Previs, S.F., Buettner, C. (2011). Brain insulin controls adipose tissue lipolysis and lipogenesis *Cell Metab*. 13: 183-194
- Schwartz, M.W., Woods, S.C., Porte, D., Seeley, R.J., Baskin, D.G. (2000). Central nervous system control of food intake. *Nature*. 404: 661-671
- Seagle, H.M., Strain, G.W., Makris, A., Reeves, R.S. (2009). Position of the American Dietetic Association: weight management. *J Am Diet Assoc*. 109(2): 330-346
- Seale, P., Bjork, B., Yang, W., Kajimura, S., Chin, S., Kuang, S., Scime, A., Devarakonda, S., Conroe, H.M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Rudnicki, M.A., Beier, D.R., Spiegelman, B.M. (2008). PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature*. 454: 961-967
- Sesti, G., Andreozzi, F., Fiorentino, T.V., Mannino, G.C., Sciacqua, A., Marini, M.A., Perticone, F. (2014). High circulating irisin levels are associated with insulin resistance and vascular atherosclerosis in a cohort of nondiabetic adult subjects. *Acta Diabetol*. 51(5): 705-13
- Seufert, J. (2004). Leptin effects on pancreatic beta-cell gene expression and function. *Diabetes*. 53: 152-158
- Strader, A.D., Woods, S.C. (2005). Gastrointestinal hormones and food intake. *Gastroenterology*. 128(1): 175-191
- Strasser, B. (2012). Physical activity in obesity and metabolic syndrome. *Ann N Y Acad Sci*. 1281: 141-159
- Tartaglia, L.A. (1997). The leptin receptor. *J Biol Chem*. 272: 6093-6096
- Todaro, G.J., Green, H. (1963). Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J. Cell Biol*. 17: 299-313
- Trayhurn, P., Drevon, C.A., Eckel, J. (2011). Secreted proteins from adipose tissue and skeletal muscle-adipokines, myokines and adipose/muscle cross-talk. *Arch Physiol Biochem*. 117(2): 47-56
- Trzeciak-Ryczek, A., Tokarz-Deptuła, B., Niedźwiedzka-Rystwej, P., Deptuła, W. (2011). Adipose tissue-component of the immune system. *Centr Eur J Immunol*. 36: 95-99

- Turer, A.T., Scherer, P.E. (2012). Adiponectin: mechanistic insights and clinical implications. *Diabetología*. 55(9): 2319-2326
- Vamvini, M. T., Aronis, K.N., Panagiotou, G., Huh, J.Y., Chamberland, J.P., Brinkoetter, M.T., Petrou, M., Christophi, C.A., Kales, S.N., Christiani, D.C., Mantzoros, C.S. (2013). Irisin mRNA and circulating levels in relation to other myokines in healthy and morbidly obese humans. *Eur J Endocrinol*. 169(6): 829-834
- Walsh, K. (2009). Adipokines, myokines and cardiovascular disease. *Circ J*. 73(1): 13-18
- Wang, M., Orci, L., Ravazzola, M., Unger, R.H. (2005). Fat storage in adipocytes requires inactivation of leptin's paracrine activity: Implications for treatment of human obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102: 18011-18016
- Wang, H., Peng, D.Q. (2011). New insights into the mechanism of low high-density lipoprotein cholesterol in obesity. *Lipids Health Dis*. 10: 176
- Wells, J.C. (2012). The evolution of human adiposity and obesity: where did it all go wrong? *Dis Model Mech*. 5(5): 595-607
- Williams, E.S., Baylin, A., Campos, H. (2007). Adipose tissue arachidonic acid and the metabolic syndrome in Costa Rican adults. *Clin Nutr*. 26(4): 474-482
- Woods, S.C. (2005). Signals that influence food intake and body weight. *Physiol Behav*. 86(5): 709-716
- Wrann, C.D., White, J.P., Salogiannis, J., Laznik-Bogoslavski, D., Wu, J., Ma, D., Lin, J.D., Greenberg, M.E., Spiegelman, B.M. (2013). Exercise induces hippocampal BDNF through a PGC-1 $\alpha$ /FNDC5 pathway. *Cell Metab*. 18(5): 649-659
- Wu, J., Boström, P., Sparks, L.M., Ye, L., Choi, J.H., Giang, A.H., Khandekar, M., Virtanen, K.A., Nuutila, P., Schaart, G., Huang, K., Tu, H., van Marken-Lichtenbelt, W.A., Hoeks, J., Enerback, S., Schrauwen, P., Spiegelman, B.M. (2012). Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell*. 150(2): 366-376
- Yasari, S., Wang, D., Prud'homme, D., Jankowski, M., Gutkowska, J., Lavoie, J.M. (2009). Exercise training decreases plasma leptin levels and the expression of hepatic leptin receptor- $\alpha$ , - $\beta$ , and - $\epsilon$  in rats. *Mol Cell Biochem*. 324(1-2): 13-20
- Yu, J.H., Kim, M.S. (2012). Molecular mechanisms of appetite regulation. *Diabetes Metab J*. 36(6): 391-398
- Yuksel, M.A., Oncul, M., Tuten, A., Imamoglu, M., Acikgoz, A.S., Kucur, M., Madazli, R. (2014). Maternal serum and fetal cord blood irisin levels in gestational diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract*. 104: 171-175
- Zachary, T., Bloomgarden, M.D. (2000). Obesity and diabetes. *Diabetes Care*. 23(10): 1584-1590
- Zebish, K., Voigt, V., Wabitsch, M., Brandsch, M. (2012). Protocol for effective differentiation of 3T3-L1 cells to adipocytes. *Anal Biochem*. 425(1): 88-90
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., Friedman, J.M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 372(6505): 425-432
- Zhang, H.J., Zhang, X.F., Ma, Z.M., Pan, L.L., Chen, Z., Han, H.W., Han, C.K., Zhuang, X.J., Lu, Y., Li, X.J., Yang, S.Y., Li, X.Y. (2013). Irisin is inversely associated with intrahepatic triglyceride contents in obese adults. *J Hepatol*. 59(3): 557-562
- Zierath, J.R., Krook, A., Wallberg-Henriksson, H. (2000). Insulin action and insulin resistance in human skeletal muscle. *Diabetología*. 43: 821-835