



UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Departamento de Medicina

Grupo Obesidómica (E023 IDIS)

Identificación mediante proteómica de nuevas adipoquinas y mioquinas implicadas en la obesidad

Arturo Roca Rivada

2013



UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Departamento de Medicina

Grupo Obesidómica (E023 IDIS)

Dr. Felipe Casanueva Freijo, Catedrático del Departamento de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela y Jefe del Servicio de Endocrinología y Nutrición del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela.

Dra. María Pardo Pérez, Investigadora del Sistema Nacional de Salud Miguel Servet, Instituto de Investigaciones Sanitarias de Santiago de Compostela (IDIS)/SERGAS.

CERTIFICAN:

Que la presente Tesis Doctoral titulada: “**Identificación mediante proteómica de nuevas adipocinas y mioquinas implicadas en la obesidad**” que presenta Arturo Roca Rivada ha sido realizada bajo su dirección en el grupo Obesidómica (IDIS) del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela, estimando que se encuentra concluida y en condiciones de ser presentada para optar al grado de Doctor en la Universidad de Santiago de Compostela.

Para que así conste a los efectos oportunos, firman la presente autorización:

Fdo. Felipe Casanueva Freijo

Fdo. María Pardo Pérez

Fdo. Arturo Roca Rivada

Santiago de Compostela, 2013

Ustedes me dicen, entonces, que tengo que perecer
como también las flores que cultivé perecerán.

¿De mi nombre nada quedará,
nadie mi fama recordará?

Pero los jardines que planté, son jóvenes y crecerán...

Las canciones que canté, ¡cantándose seguirán!

HUEXOTZÍNCATZIN

Príncipe de Texcoco, 1484

**Dedicado a Álex,
Porque la inmortalidad
reside en la memoria.**

Abreviaturas

1-DE	Electroforesis en una dimensión/monodimensional
2-DE	Electroforesis en dos dimensiones/bidimensional
ABA	Anorexia basada en la actividad
ACBP	Proteína de unión a acil-CoA
AgRP	Proteína r-agouti
ARC	Núcleo arcuato
ARNm	ARN mensajero
bFGF	Factor de crecimiento básico de fibroblastos
BMP-1	Proteína morfogénica ósea 1
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
CART	Transcrito regulado por cocaína y anfetamina
CABA	Control anorexia basada en la actividad
CCK	Colecistoquinina
CDIO	Control obesidad inducida por la dieta
CILAIR	Comparación de ratios de incorporación de aminoácidos marcados con isótopos estables
CRH	Hormona liberadora de corticotropina
DDP4	Dipeptidil peptidasa 4
DIO	Obesidad inducida por la dieta
DMEM	Medio de cultivo <i>Eagle</i> modificado por Dulbecco
DMN	Núcleo dorsomedial
DTT	Ditiotreitol
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
ERKs	Quinasas reguladoras de la señal extracelular
FABP	Proteína de unión a ácidos grasos
FBS	Suero fetal bovino
FDG	¹⁸ F-fluorodeoxiglucosa
FFAs	Ácidos grasos Libres
FGF-21	Factor de crecimiento de fibroblastos 21
FNDC5	Fibronectina tipo III con 5 dominios
FSH	Hormona folículo estimulante
GH	Hormona de crecimiento
GHS-R	Receptor de secretagogos de la hormona de crecimiento
Glut4/SLC2A4	Transportador de glucosa 4 dependiente de insulina
GREM1	Gremlina 1
hASC	Células madre mesenquimales derivadas de TA humano
HOMA-IR	Modelo homeostático de evaluación de la resistencia a insulina
HPLC-MS/MS; LC-MS/MS	Cromatografía bidimensional acoplada a un espectrómetro de masas

IEF	Isoelectroenfoque
IFNG	Interferón gamma
IL	Interleuquina
IMC	Índice de masa corporal
INHBB	Inhibina beta B
iTRAQ	Marcaje isobárico para la cuantificación absoluta y relativa
KRH	Tampón Krebs-Ringer-Hepes
LEPR	Receptor de leptina
LH	Hormona luteinizante
MALDI	Ionización láser asistida por matriz
MCH	Hormona concentradora de melanina
MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos-1
MGP	Proteína gla de la matriz
MMP-2	Metaloproteinasa 2 de matriz
MS	Espectrometría de masas
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem
MVECS	Células endoteliales microvasculares
myf-5	Factor de transcripción miogénico 5
Mw	Masa molecular
NFkB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NPY	Neuropéptido Y
PAI-1	Inhibidor del activador del plasminógeno-1
PBS	Tampón fosfato salino
PCA	Análisis de los componentes principales
PEDF	Factor derivado del pigmento epitelial
PET-CT	Tomografía por emisión de positrones - tomografía computerizada
PGC-1α	Coactivador-1 α del receptor activado de proliferación de los peroxisomas y
pi	Punto isoeléctrico
POMC	proopiomelanocortina
PP	Polipéptido pancreático
PTN	Pleiotrofina
PVN	Núcleo paraventricular
PYY	Péptido tirosina-tirosina
qRT-PCR	PCR a tiempo real cuantitativa
RE	Retículo endoplasmático
RIPA	Tampón de radioinmunoprecipitación
ROS	Especies reactivas del oxígeno
RP-HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa
SDS	Dodecilsulfato sódico
SELDI	Desorción/ionización por láser de superficie variante mejorada
SILAC	Aminoácidos marcados con isótopos estables en cultivos celulares
SLPI	Inhibidor de la peptidasa secretoria de los leucocitos 1
SNC	Sistema nervioso central
SNF2-α	Activador probable de la transcripción global 2 alpha

SPARC	Proteína ácida secretada rica en cisteína
TA	Tejido adiposo
TAB	Tejido adiposo blanco
TAP	Tejido adiposo pardo
TAS	Tejido adiposo subcutáneo
TASa	Tejido adiposo subcutáneo abdominal
TASf	Tejido adiposo subcutáneo femoral
TASg	Tejido adiposo subcutáneo gluteal
TAV	Tejido adiposo visceral
TAVg	Tejido adiposo visceral gonadal
TAVm	Tejido adiposo visceral mesentérico
TAVo	Tejido adiposo visceral omental
TAVr	Tejido adiposo visceral retroperitoneal
TGF-β	Factor de crecimiento transformante β
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
TOF	Tiempo de vuelo
TZD	Tiazolidinediona
UCP-1	Proteína desacopladora tipo 1
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad
VMN	Núcleo ventromedial
ZDF	Modelo de ratas Zucker diabéticas

Índice

	<u>Página</u>
Índice de figuras _____	21
Índice de tablas _____	25
I. Introducción _____	27
1. Los orígenes de la obesidad _____	29
2. El problema actual de la obesidad _____	30
2.1 Actualidad: incidencia y cómo tratar la obesidad. _____	34
2.1.1 Dieta _____	34
2.1.2 Ejercicio _____	34
2.1.3 Tratamiento farmacológico _____	35
2.1.4 Cirugía bariátrica _____	36
2.2 Enfermedades asociadas _____	36
2.2.1 Incremento de tejido adiposo corporal _____	36
2.2.2 Ausencia de ejercicio físico _____	38
3. Regulación de la ingesta _____	41
3.1 Sistema nervioso central: El hipotálamo _____	41
3.2 Órganos periféricos _____	43
3.2.1 Tracto gastrointestinal _____	43
3.2.2 Páncreas _____	44
3.2.3 Estómago _____	44
3.2.4 Hígado _____	46
4. Tejido adiposo _____	49
4.1 Adipocitos _____	49
4.1.1 Adipocito blanco _____	50
4.1.2 Adipocito marrón _____	51
4.1.3 Adipocito beis _____	51

4.2 Tejido adiposo blanco _____	52
4.2.1 Localización _____	52
4.2.2 TAB como órgano endocrino _____	54
4.2.2.1 Leptina _____	55
4.2.2.2 Adiponectina _____	56
4.2.2.3 Otras adipoquinas _____	56
4.3 Tejido adiposo pardo _____	57
4.3.1 Localización _____	58
4.3.2 Tejido adiposo pardo como órgano secretor _____	60
5. Tejido muscular esquelético _____	60
5.1 Clasificación de los tipos de fibras musculares _____	61
5.2 Variabilidad _____	63
5.3 Plasticidad muscular _____	64
5.4 El músculo como órgano endocrino _____	65
5.4.1 Interleuquina-6: la primera mioquina descrita. _____	66
5.4.2 El papel de la proteína PGC-1 α en la expresión de los “genes del ejercicio” _____	67
5.4.3 La FNDC5/irisina como mioquina inducida por PGC-1 α _____	69
6. Comunicación músculo-adiposo _____	71
7. Secreción proteica _____	75
7.1 Tipos de Secreción _____	75
7.2 Softwares de predicción _____	77
8. Proteómica como herramienta de estudio hormonal _____	79
8.1 Introducción _____	79
8.2 Proteómica clínica aplicada al estudio de la obesidad _____	79
8.3 Estudios proteómicos del secretoma de tejido adiposo _____	82
8.3.1 Secretoma del TA completo _____	82
8.3.2 Secretoma de adipocitos maduros _____	83
8.3.3 Secretoma de la fracción EV _____	85
8.3.4 Secretoma durante la diferenciación adipocitaria _____	85
8.3.5 Secretomas de diferentes depósitos de tejido adiposo. _____	87
8.4 Estudios proteómicos del secretoma de tejido muscular esquelético _____	88
8.4.1 Panorama actual _____	88

8.4.2 Secretomas de líneas celulares condicionadas _____	88
8.4.3 Secretomas durante la diferenciación de miotubos _____	89
8.4.4 Secretomas de células musculares humanas _____	91
II. Objetivos _____	93
III. Materiales y métodos _____	97
1. Técnicas experimentales _____	99
1.1 Animales de experimentación _____	99
1.1.2. Modelos animales _____	99
1.1.2.1 Ejercicio _____	99
1.1.2.2 Anorexia basada en la actividad. _____	100
1.1.2.3 Obesidad inducida por la dieta. _____	101
1.1.2.4 Modelo de ratas Zucker diabéticas _____	101
1.2 Líneas celulares _____	102
1.2.1 3T3-L1 _____	102
1.2.2 L6E9 _____	102
1.2.3 Secretomas de líneas celulares 3T3-L1 y L6E9 _____	102
1.3 Extracción de tejido adiposo humano _____	103
1.4 Extracción de tejidos procedentes de animales _____	103
1.4.1 Localización de los tejidos extraídos _____	103
1.4.2 Cultivos de explantes _____	104
1.5 Establecimiento de cultivos primarios en tejido adiposo blanco. _____	105
1.5.1 Dispersión tisular _____	105
1.5.2 Separación de las fracciones celulares _____	106
1.5.2.1 Obtención de los adipocitos maduros _____	107
1.5.2.2 Obtención de las células del estroma del tejido adiposo. _____	107
1.6 Secretomas de cultivos primarios de tejido adiposo _____	108
1.6.1 Adipocitos maduros _____	108
1.6.2 Células del estroma de tejido adiposo _____	108

2. Métodos analíticos	108
2.1 Estudios de proteína	108
2.1.1 Extracción de proteínas totales en líneas celulares y cultivos primarios	108
2.1.1.1 Secretomas	108
2.1.1.2 Proteína intracelular	109
2.1.2.1 Secretomas:	109
2.1.2.1 Proteína intracelular.	109
2.1.3 Cuantificación de proteína	110
2.1.4 Inmunodetección mediante <i>Western Blot</i>	110
2.1.4.1 Preparación de la muestra	110
2.1.4.2 Electroforesis monodimensional (1-DE)	111
2.1.4.3 Transferencia	111
2.1.4.4 Tinción con rojo Ponceau S	111
2.1.4.5 Bloqueo de la membrana	112
2.1.4.6 Inmunodetección	112
2.1.4.7 Cuantificación	112
2.1.5 Inmunoensayo enzimático (ELISA) para fetuina A	113
2.1.6 Radioinmunoensayo (RIA)	114
2.1.6.1 RIA Ghrelina	114
2.1.6.2 RIA Insulina	115
2.1.6.3 RIA Leptina	117
2.1.7 Inmunohistoquímica	118
2.2 Estudios de expresión (ARNm): PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR)	118
2.2.1 Extracción RNA-Trizol	119
2.2.2 Tratamiento con DNasas	120
2.2.3 Retrotranscripción	120
2.2.4 qRT-PCR	121
2.3 Estudios de composición corporal: Imagen por resonancia magnética (IRM)	122
2.4 Estudios metabólicos	123
2.4.1 Determinación de glucosa en sangre	123
2.4.2 Modelo de evaluación de la homeostasis (índice HOMA)	123
2.5 Análisis estadístico	123

3. Técnicas proteómicas	123
3.1 Electroforesis bidimensional (2-DE)	124
3.1.1 Primera dimensión: Isoelectroenfoque (IEF)	124
3.1.2 Segunda dimensión: SDS-PAGE	126
3.1.3 Tinción de geles de geles de poliacrilamida	127
3.1.3.1 Tinción de proteínas con azul de coomassie.	127
3.1.3.2 Tinción de proteínas con fluorescencia (Sypro Ruby)	128
3.1.4 Almacenaje de geles	129
3.2 Inmunodetección en geles 2D	129
3.3 Análisis de imagen diferencial	130
3.4 Digestión proteica en gel	132
3.5 Espectrometría de masas	134
3.6 Predicción de proteínas secretadas	135
3.7 Análisis de la interacción entre proteínas	135
IV. Resultados	137
1. Establecimiento y caracterización de modelos animales en diferentes situaciones fisiológicas y patológicas.	139
1.1 Restricción calórica, ejercicio y anorexia basada en la actividad (ABA)	139
1.1.1 Parámetros fisiológicos	139
1.1.2 Parámetros hormonales y metabólicos	141
1.1.3 Expresión de los receptores de leptina y ghrelina en tejidos periféricos.	145
1.2 Obesidad inducida por la dieta (DIO)	148
1.2.1 Parámetros fisiológicos	148
1.2.2 Parámetros hormonales y metabólicos	150
2. Caracterización del secretoma del tejido adiposo blanco en función de su localización anatómica.	152
2.1 Establecimiento y validación de los secretomas a partir de explantes	152
2.2 Mapas 2-DE de referencia de los secretomas de tejido adiposo visceral, subcutáneo y gonadal	153
2.3 Análisis diferencial del secretoma de tejido adiposo visceral, subcutáneo y gonadal.	171

3. Validación y caracterización de la fetuina A como nueva adipoquina.	174
3.1 La fetuina A de tejido adiposo es secretada de forma exclusiva por los adipocitos maduros.	174
3.2 El tejido adiposo secreta varias formas fosforiladas de fetuina A.	174
3.3 Validación de la expresión de fetuina A en animales bajo diferentes condiciones fisiológicas o patológicas.	175
3.4 Caracterización de la presencia de fetuina A en suero y secretomas de animales bajo diferentes condiciones fisiológicas o patológicas.	178
4. Caracterización del secretoma de tejido muscular para la identificación de nuevas miokinas	180
4.1 Establecimiento y optimización de la incubación de explantes de tejido muscular de rata para el análisis de su secretoma y su alteración tras el ejercicio.	180
4.2 Mapas 2-DE de referencia de los secretomas de tejido muscular glicolítico-rápido y oxidativo-lento.	184
4.3 Estudio diferencial entre los secretomas del tejido muscular esquelético glicolítico-rápido y oxidativo-lento bajo condiciones <i>ad libitum</i> .	188
4.4 Estudio del efecto del ejercicio en los secretomas del tejido muscular glicolítico-rápido y oxidativo-lento.	190
5. Caracterización de la hormona FNDC5/irisina.	195
5.1 FNDC5/irisina como mioquina.	195
5.1.1 Validación de las muestras para su análisis e identificación de la banda de inmunodetección perteneciente a FNDC5/irisina	195
5.1.2 La secreción y expresión de FNDC5/irisina en el tejido muscular esquelético se ve afectada por la restricción calórica y por el ejercicio.	197
5.1.2.1 Secreción de FNDC5/irisina	197
5.1.2.2 Expresión de FNDC5 intracelular y ARNm	198
5.1.3 La secreción y expresión de FNDC5/irisina en el tejido muscular esquelético también se encuentra alterada en situaciones patológicas.	199
5.1.3.1 Secreción de FNDC5/irisina	199
5.1.3.2 Expresión de FNDC5 intracelular y ARNm	201
5.2 FNDC5/irisina como adipoquina	203
5.2.1 El tejido adiposo blanco también secreta FNDC5/irisina.	203
5.2.2 La secreción y expresión de FNDC5/irisina en el tejido adiposo está modulada por el ejercicio y el estado nutricional.	205
5.2.2.1 Secreción de FNDC5/irisina	205

5.2.2.2 Expresión de FNDC5 intracelular y ARNm _____	207
5.2.3 La secreción y expresión de FNDC5/irisina en el tejido adiposo también se encuentra alterada en situaciones patológicas. _____	209
5.2.3.1 Secreción de FNDC5/irisina _____	209
5.2.3.2 Expresión de FNDC5 intracelular y ARNm _____	210
5.2.4 Los niveles de FNDC5/irisina circulantes reflejan la modulación observada en los secretomas de tejido muscular esquelético y adiposo. _____	212
5.2.5 La expresión de PGC1- α en el tejido adiposo no se corresponde en la mayoría de los casos con los niveles de FNDC5 observados. _____	213
5.2.6 Capacidad de <i>browning</i> del tejido adiposo _____	215
5.2.7 La secreción de FNDC5/irisina la llevan a cabo los adipocitos maduros de rata y en el tejido adiposo humano también aparece expresión y secreción. _____	217

V. Discusión _____ 219

1. Establecimiento y caracterización de modelos animales en diferentes situaciones fisiológicas y patológicas. _____	222
1.1 Restricción calórica, ejercicio y anorexia basada en la actividad (ABA) _____	222
1.2 Obesidad inducida por la dieta (DIO) _____	226
2. Caracterización del secretoma del tejido adiposo blanco en función de su localización anatómica. _____	228
2.1 Establecimiento y validación de los secretomas a partir de explantes de TA _	229
2.2 Los mapas 2-DE de referencia de los secretomas de TAVo, TAS y TAVg reafirman la hipótesis de que el tejido adiposo presenta diferentes funciones dependiendo de su localización anatómica. _____	230
2.3 El análisis diferencial del secretoma de los tres depósitos de TA muestra la existencia de grandes diferencias con respecto a su capacidad secretora. _____	231
3. Validación y caracterización de la fetuina A como nueva adipoquina. _____	232
3.1 La secreción de fetuina A en el TA se produce exclusivamente por los adipocitos y los niveles séricos están afectados por la obesidad y la restricción calórica. _____	233
3.2 El TAVo participa en mayor medida que el TAS en la modulación de la expresión y secreción de fetuina A. _____	234
4. Caracterización del secretoma de tejido muscular para la identificación de nuevas miokinas _____	235

4.1 Desarrolló de una metodología de cultivo de explantes para la identificación de proteínas secretadas por el tejido muscular esquelético. _____	236
4.2 Los músculos sóleo y gastrocnemio presentan diferencias en su perfil de secreción según la composición de fibras mayoritaria y el ejercicio físico. _____	238
5. Caracterización de la hormona FNDC5/irisina. _____	240
5.1 La FNDC5/irisina como mioquina _____	241
5.1.1 Validación de las muestras para su análisis e identificación de la banda de inmunodetección perteneciente a FNDC5/irisina _____	241
5.1.2 La secreción y expresión de FNDC5/irisina en el tejido muscular esquelético se ve afectada por la restricción calórica y por el ejercicio. _____	242
5.1.3 La secreción y expresión de FNDC5/irisina en el tejido muscular esquelético también se encuentra alterada en situaciones patológicas. _____	243
5.2 FNDC5/irisina como adipoquina _____	245
5.2.1 El tejido adiposo blanco también secreta FNDC5/irisina. _____	245
5.2.2 La secreción y expresión de FNDC5/irisina en el tejido adiposo está modulada por el ejercicio y el estado nutricional, así como en situaciones patológicas. _____	245
VI. Conclusiones _____	249
VII. Apéndice _____	255
VIII. Bibliografía _____	273

Índice de figuras

	<u>Página</u>
Figura 1	29
Figura 2.....	32
Figura 3.....	33
Figura 4.....	35
Figura 5.....	37
Figura 6.....	39
Figura 7.....	40
Figura 8.....	42
Figura 9.....	48
Figura 10.....	50
Figura 11.....	53
Figura 12.....	54
Figura 13.....	59
Figura 14.....	62
Figura 15.....	66
Figura 16.....	68
Figura 17.....	70
Figura 18.....	71
Figura 19.....	73
Figura 20.....	76
Figura 21.....	77
Figura 22.....	81
Figura 23.....	84
Figura 24.....	87
Figura 25.....	90
Figura 26.....	99
Figura 27.....	100
Figura 28.....	104
Figura 29.....	105
Figura 30.....	106
Figura 31.....	107
Figura 32.....	122
Figura 33.....	124
Figura 34.....	126
Figura 35.....	127

Figura 36.....	128
Figura 37.....	129
Figura 38.....	130
Figura 39.....	131
Figura 40.....	132
Figura 41.....	134
Figura 42.....	140
Figura 43.....	142
Figura 44.....	143
Figura 45.....	144
Figura 46.....	147
Figura 47.....	149
Figura 48.....	150
Figura 49.....	151
Figura 50.....	151
Figura 51.....	153
Figura 52.....	154
Figura 53.....	155
Figura 54.....	156
Figura 55.....	158
Figura 56.....	166
Figura 57.....	167
Figura 58.....	168
Figura 59.....	169
Figura 60.....	170
Figura 61.....	172
Figura 62.....	174
Figura 63.....	175
Figura 64.....	176
Figura 65.....	177
Figura 66.....	178
Figura 67.....	179
Figura 68.....	181
Figura 69.....	182
Figura 70.....	183
Figura 71.....	185
Figura 72.....	186
Figura 73.....	187
Figura 74.....	189
Figura 75.....	191
Figura 76.....	194
Figura 77.....	196
Figura 78.....	198
Figura 79.....	200
Figura 80.....	201

Figura 81.....	202
Figura 82.....	204
Figura 83.....	206
Figura 84.....	208
Figura 85.....	210
Figura 86.....	211
Figura 87.....	212
Figura 88.....	213
Figura 89.....	214
Figura 90.....	216
Figura 91.....	217
Figura 92.....	248

Índice de tablas

	<u>Página</u>
Tabla 1.....	31
Tabla 2.....	31
Tabla 3.....	45
Tabla 4.....	47
Tabla 5.....	63
Tabla 6.....	74
Tabla 7.....	78
Tabla 8.....	113
Tabla 9.....	115
Tabla 10.....	116
Tabla 11.....	117
Tabla 12.....	121
Tabla 13.....	125
Tabla 14.....	125
Tabla 15.....	159
Tabla 16.....	162
Tabla 17.....	163
Tabla 18.....	164
Tabla 19.....	173
Tabla 20.....	187
Tabla 21.....	190
Tabla 22.....	192
Tabla 23.....	193
Tabla suplementaria 1.....	260
Tabla suplementaria 2.....	262
Tabla suplementaria 3.....	264
Tabla suplementaria 4.....	265
Tabla suplementaria 5.....	267
Tabla suplementaria 6.....	269
Tabla suplementaria 7.....	270
Tabla suplementaria 8.....	271
Tabla suplementaria 9.....	272

I. Introducción

1. Los orígenes de la obesidad

Los seres vivos se caracterizan por presentar un sistema de regulación energética muy preciso y equilibrado basado en una combinación eficaz de varios mecanismos compensatorios. Este sistema de regulación es el pilar del equilibrio entre la producción y el gasto energético; cuando este equilibrio se ve afectado sin que los mecanismos compensatorios puedan actuar eficazmente, se producen ciertas complicaciones en el metabolismo del individuo, que pueden derivar en diversas enfermedades [1].

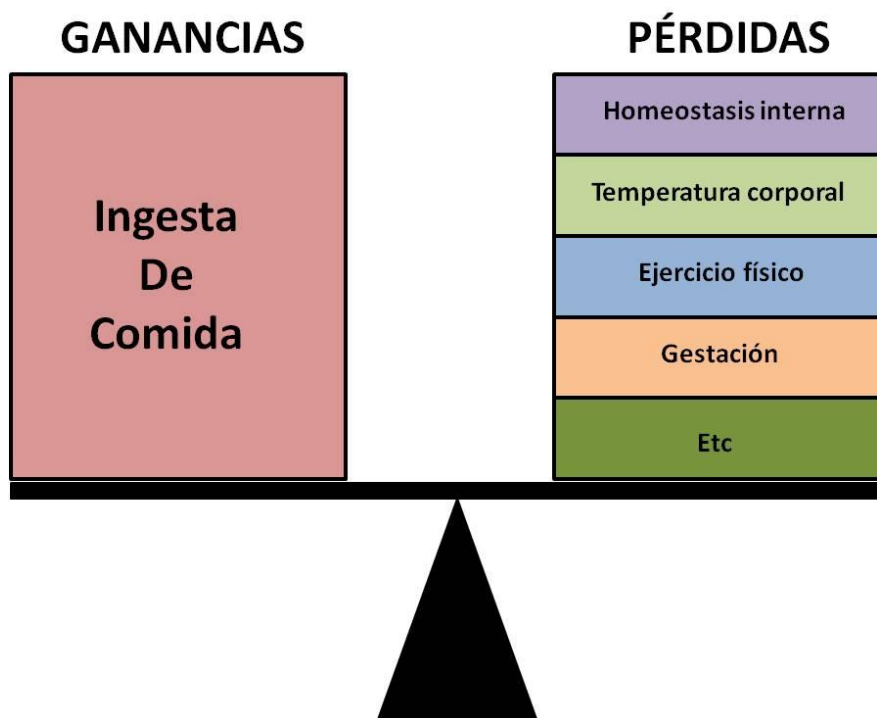


Figura 1 : Representación de la balanza del equilibrio energético. Si el balance tiende hacia la izquierda (mayor aporte calórico) pueden producirse enfermedades relacionadas con un exceso en el almacenamiento energético y sus consecuencias metabólicas, mientras que si tiende hacia la derecha (mayor consumo calórico) se producen enfermedades relacionadas con el déficit energético y la desnutrición.

En humanos, la energía se obtiene exclusivamente a través del consumo de alimentos, sin embargo la demanda energética responde a diversos factores como son el mantenimiento de la temperatura corporal, la homeostasis interna, los largos periodos de gestación y lactancia o la actividad física (figura 1). Por este motivo, se ha desarrollado un complejo sistema de almacenamiento energético para que esta energía pueda estar disponible en el momento requerido. El tejido adiposo es el principal implicado en este sistema, manteniendo y movilizand reservas de energía en forma de triglicéridos. Este tejido se comporta con mucha plasticidad permitiendo un

almacenamiento energético casi ilimitado entre los diversos depósitos localizados a lo largo del cuerpo [2].

Histórica y evolutivamente, el ser humano ha visto como se ha pasado de un modo de vida en el que escaseaban los alimentos y la balanza se inclinaba hacia el déficit energético, a un modo de vida en el que este patrón se ha invertido completamente en las sociedades modernas industrializadas, llegando en muchos casos a producirse serios problemas derivados de un exceso en la acumulación de tejido adiposo corporal. Si se observa el comportamiento de los primates actuales, estos gastan más del 30% de su disponibilidad energética diaria en la búsqueda de alimentos; como compartir comida es raro en estas especies y se desconoce que la almacenen, tienen que buscar alimentos cada día de manera individual. Por este motivo es extremadamente raro ver signos de obesidad en los primates que viven en libertad, sin embargo, cuando estos animales están en cautividad, donde la actividad física está restringida y el acceso a los alimentos es sencillo, tienen una gran facilidad para desarrollar problemas metabólicos y enfermedades como la diabetes tipo II o problemas cardiovasculares [3].

Por todo ello es importante que en la sociedad humana actual exista un control externo, independiente del llevado a cabo por el propio organismo, para regular este desequilibrio, que se basaría fundamentalmente en un mayor control de la ingesta diaria, tanto en la cantidad como en la calidad, a la vez que se induce un mayor consumo energético a través de la actividad física [4].

2. El problema actual de la obesidad

La obesidad se define como una acumulación excesiva de tejido adiposo corporal. En la práctica clínica, la cantidad de grasa corporal se suele estimar de varias maneras, siendo las más utilizadas el índice de masa corporal (IMC) (tabla 1A), que hace una correlación entre el peso y la altura del individuo; y la medición de la circunferencia de la cintura (tabla 1B) [5]. Sin embargo estos métodos son limitados, ya que se basan en la medida indirecta del tejido adiposo corporal, por lo que se estima recomendable la combinación de estos métodos con otros capaces de realizar mediciones directas, en especial de la acumulación de tejido adiposo visceral, considerado el de mayor riesgo metabólico (tabla 2) [6].

A.

IMC (kg m ⁻²)	Clasificación de la OMS
<18.5	Bajo peso
18.5-24.9	Normopeso
25.0-29.9	Sobrepeso de grado 1
30.0-39.9	Sobrepeso de grado 2
≥40.0	Sobrepeso de grado 3

B.

Riesgo de padecer complicaciones metabólicas		
	Riesgo moderado	Riesgo alto
Hombres	≥94 cm	≥102 cm
Mujeres	≥80 cm	≥88 cm

Tabla 1: Clasificación de los grados y riesgos de la obesidad según las medidas indirectas de (a) IMC y (b) circunferencia de la cintura. Modificado de [5].

Método	Tipo de medición	Ventajas	Desventajas
Medidas antropométricas: IMC, circunferencia de la cintura, ratio cadera/cintura, pliegues cutáneos.	Medida indirecta: Composición corporal total y grasa abdominal	Rápido, el más accesible, bajo coste y sin radiación	No distingue entre tejido magro y grasa corporal o grasa visceral, baja precisión, especificidad y reproducibilidad.
Bioimpedancia	Medida indirecta: composición corporal total	Rápido, accesible, bajo coste y sin radiación	Baja precisión y especificidad, no mide grasa visceral, afectado por el estado de hidratación y la sobrecarga de fluidos.
Absorciometría dual de rayos x	Medida indirecta: Composición corporal total y grasa abdominal	Rápido, accesible y de bajo coste. Medición precisa de grasa abdominal	Pequeña cantidad de radiación: 0.003-0.6 mSv, imposibilidad de distinguir entre tejido adiposo visceral y subcutáneo abdominal, poco preciso en obesidad.
Tomografía computerizada	Medida directa: grasa corporal total, abdominal y hepática.	Accesible y reproducible. Alta especificidad y precisión	Radiación: 6-10 mSv, caro, limitaciones de peso.
Imagen de resonancia magnética y espectroscopía de resonancia magnética	Medida directa: grasa corporal total, abdominal, hepática, pancreática y ectópica.	Sin radiación	Caro, de difícil accesibilidad, requiere demasiado tiempo.
Ultrasonidos	Medida indirecta: grasa hepática, subcutánea, visceral y epicárdica.	Bajo coste	Pobre reproducibilidad y precisión.
Tomografía de emisión de positrones	Tejido adiposo pardo	Buena correlación con los estudios realizados en cadáveres	Cara, de difícil accesibilidad, afectada por la temperatura externa y pobre reproducibilidad

Tabla 2: Diferentes técnicas para la medición del tejido adiposo corporal. Modificado de [6].

En la actualidad se está desarrollando un mapa genético en el que se están identificando los genes que juegan un papel, en mayor o menor medida, en el desarrollo de la obesidad. Se cree que como mucho el 50 % de la variabilidad en el peso corporal está regido por factores genéticos, pero se conocen muy pocas alteraciones genéticas que confieran una predisposición al sobrepeso, por lo que los factores ambientales (dieta, actividad física o factores psicosociales) juegan un papel clave en el desarrollo de la obesidad en la actualidad (figura 2) [7].

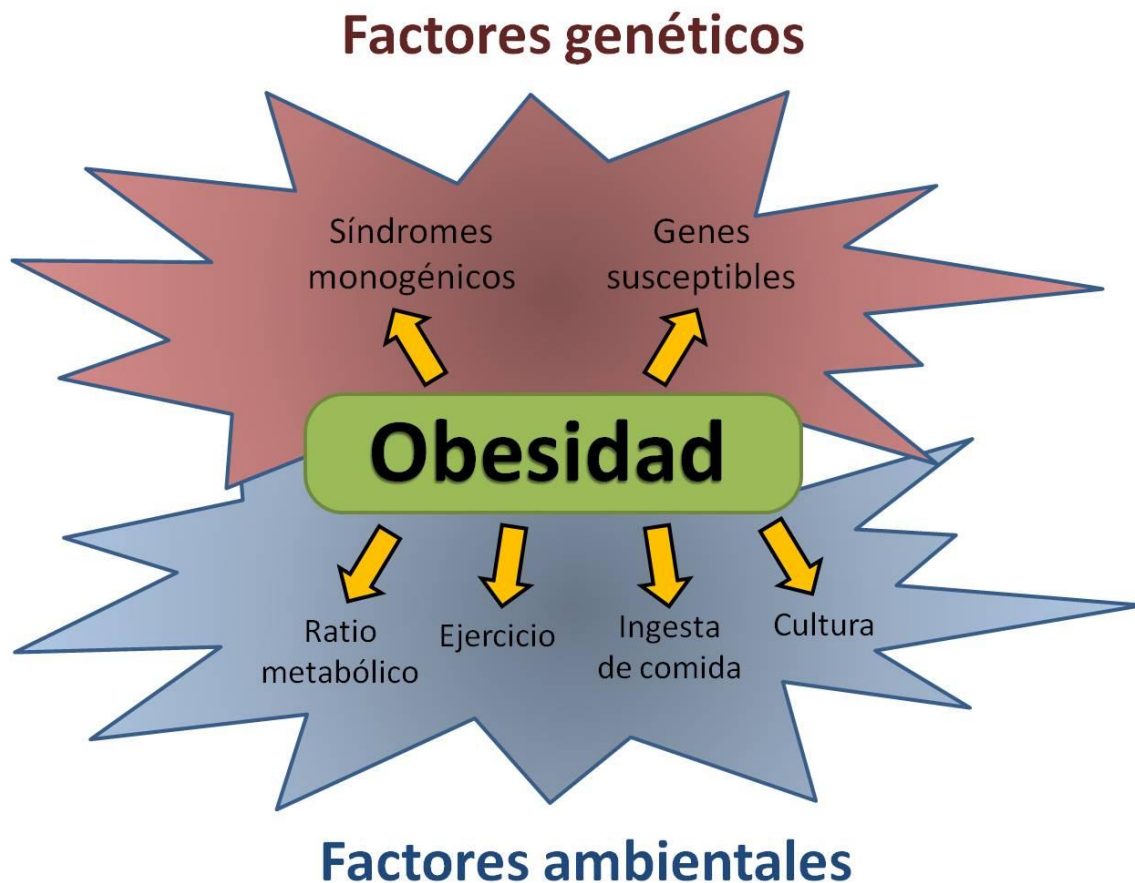


Figura 2: Distintos factores que afectan al desarrollo de la obesidad. Modificada de [5].

La obesidad es uno de los mayores problemas sanitarios a los que se enfrentan las sociedades modernas. Según datos de la Organización Mundial de la Salud la obesidad mundial se ha duplicado en menos de 30 años. En 2008, más de 1400 millones de adultos (mayores de 20 años) eran obesos, alrededor de 200 millones de hombres y 300 millones de mujeres; pero el dato más preocupante es el de la obesidad en menores de 5 años, ya que en 2010 se habían contabilizado más de 40 millones de casos de sobrepeso. La obesidad puede ser considerada ya una pandemia a nivel global, puesto que el 65% de la población humana vive en países en donde el sobrepeso ya mata a más gente que la insuficiencia ponderal (figura 3) [8].

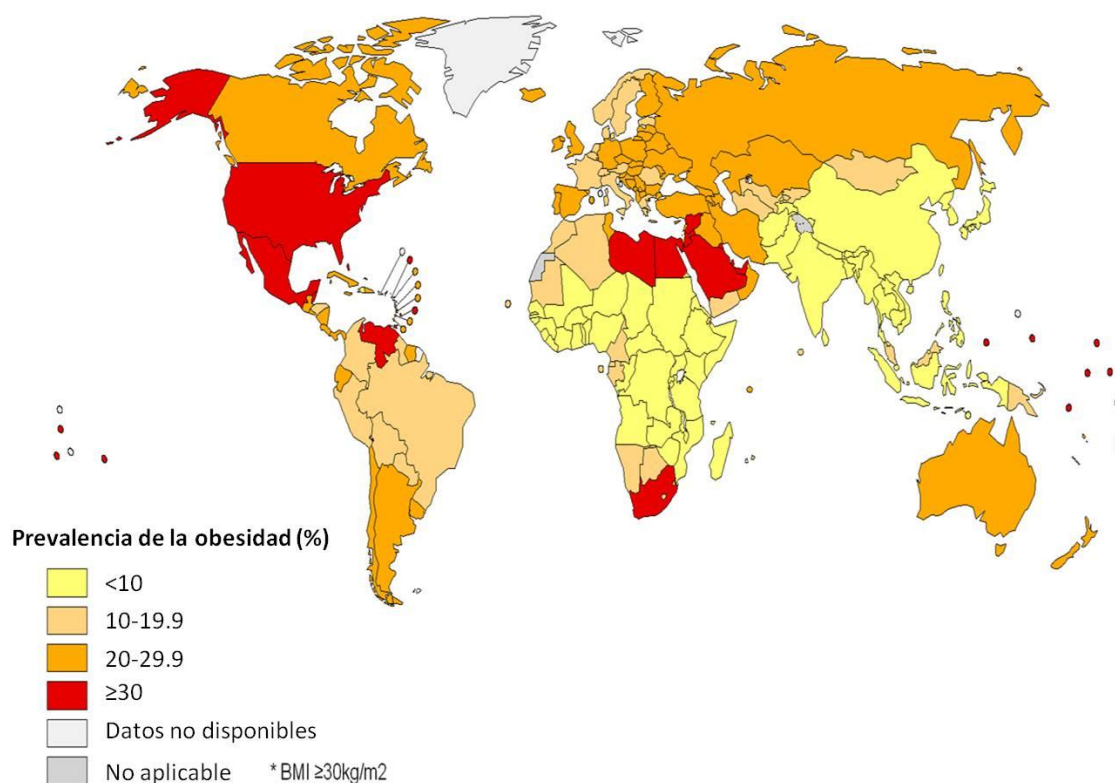


Figura 3: Mapa global de la obesidad en 2008. Modificada de [8].

El coste hospitalario del tratamiento de la obesidad y sus enfermedades asociadas es enorme, por ejemplo en EUA, el cuidado de pacientes de diabetes tipo 2 conlleva un coste anual de 113 millones de dólares, mientras que el gasto médico atribuido a la obesidad alcanza cifras de hasta 147 millones de dólares (datos de 2008). Se calcula que las economías e infraestructuras de los países desarrollados (en especial los más débiles) se verán desbordadas en pocos años ya que se cree que los pacientes de obesidad y enfermedades asociadas cada vez serán más numerosos [9].

En concreto, en España los datos de prevalencia más recientes en adultos, obtenidos del estudio ENRICA en 2011, aportan una prevalencia de obesidad del 22,9% y de sobrepeso del 39,4% sobre una población de 12036 personas encuestadas. Los datos epidemiológicos en edad infantil española (estudio ALADINO) muestran una elevada prevalencia, presentando un 45,2% exceso de peso del cual el 26,1% corresponde a sobrepeso y el 19,1% a obesidad. España es el tercer país de la Unión Europea, detrás de Italia y Malta, con mayor porcentaje de niños obesos o con sobrepeso entre los 2 y los 9 años, aproximadamente el 17,8% según las conclusiones del estudio IDEFICS presentado por la Comisión Europea. Los kilos que ganan los europeos acarrearán consecuencias desastrosas para la salud pública y suponen un

enorme gasto económico calculado entre el 2 y el 8 por ciento del gasto sanitario [10][10][10][10][10][10][10][10][10][10].

2.1 Actualidad: incidencia y cómo tratar la obesidad.

Los principales métodos de actuación para combatir el sobrepeso son la dieta y el ejercicio, y cuando estos fallan se combinan con la terapia farmacológica. En casos más extremos, o en casos en donde la obesidad viene asociada a una diabetes tipo II, la solución más eficaz es la cirugía [11].

2.1.1 Dieta

A lo largo de los últimos años han ido surgiendo distintos tipos de dietas, unas más efectivas que otras, sin embargo la mayoría de ellas se basan en dos principios: la restricción calórica y la reducción del apetito. Se han abordado estrategias que van desde el incremento en el porcentaje de proteínas consumidas, las comidas bajas en carbohidratos o la sustitución en la dieta de los ácidos grasos de cadena larga por ácidos grasos de cadena media/corta [12]. Uno de los principales problemas a los que se enfrenta este tipo de estrategia de reducción de peso corporal es la baja adhesión de los pacientes a continuar las dietas a lo largo del tiempo, los beneficios evidentes que se observan durante los primeros meses de dieta, se reducen e incluso empeoran en un gran porcentaje de pacientes debido a su incapacidad de cumplir estrictamente con la dieta prescrita, ya que la modificación de la dieta tiene que implicar también un cambio en su estilo de vida. Se estima que la efectividad de este tratamiento a largo plazo supone una reducción del 10% del peso inicial, lo que implica una mayor prevención de enfermedades relacionadas con la obesidad como pueden ser la diabetes tipo 2 y la hipertensión [13].

2.1.2 Ejercicio

El ejercicio ha demostrado ser un potente aliado para combatir la obesidad, en numerosos estudios se ha observado que incluso un pequeño aumento de la actividad física del individuo puede derivar en la mejora de las condiciones generales, y como es de esperar, un mayor incremento del mismo conlleva unos mayores beneficios [14], por lo que los especialistas recomiendan mantener rutinas de ejercicio físico independientemente de padecer obesidad, incluso en ancianos [15]. El ejercicio físico no contribuye únicamente a aumentar el gasto energético y la pérdida de tejido adiposo, también protege frente a la pérdida de masa muscular, mejora las condiciones cardiorespiratorias, reduce los riesgos de sufrir enfermedades

cardiológicas y metabólicas relacionadas con la obesidad, e incluso aporta al individuo una mayor sensación de bienestar. Al igual que ocurre con las dietas, el ejercicio para una persona habituada al sedentarismo implica un cambio en su estilo de vida, por lo que es muy importante monitorizar el estado psicológico del individuo y estimular y potenciar mediante diferentes mecanismos las rutinas de ejercitación física [16].

2.1.3 Tratamiento farmacológico

En los últimos años se han producido numerosos avances en el ámbito del estudio de la regulación del peso corporal, sin embargo el progreso en la terapia farmacológica para combatir la obesidad está siendo muy lento [11].

Los escasos tratamientos existentes en la actualidad, así como las investigaciones que se encuentran en curso; se centran en cinco estrategias principales para lograr la pérdida de peso (figura 4) [17]:

- Reducción de la ingesta de comida mediante la estimulación del efecto de las señales anorexigénicas o el bloqueo de las señales orexigénicas.
- Bloquear la absorción de nutrientes en el estómago, especialmente la grasa.
- Aumentar la termogénesis para disipar el exceso de energía almacenada en forma de calor.
- La modulación del metabolismo o el almacenamiento de grasas y proteínas.
- Modulación del sistema central de regulación del peso corporal.

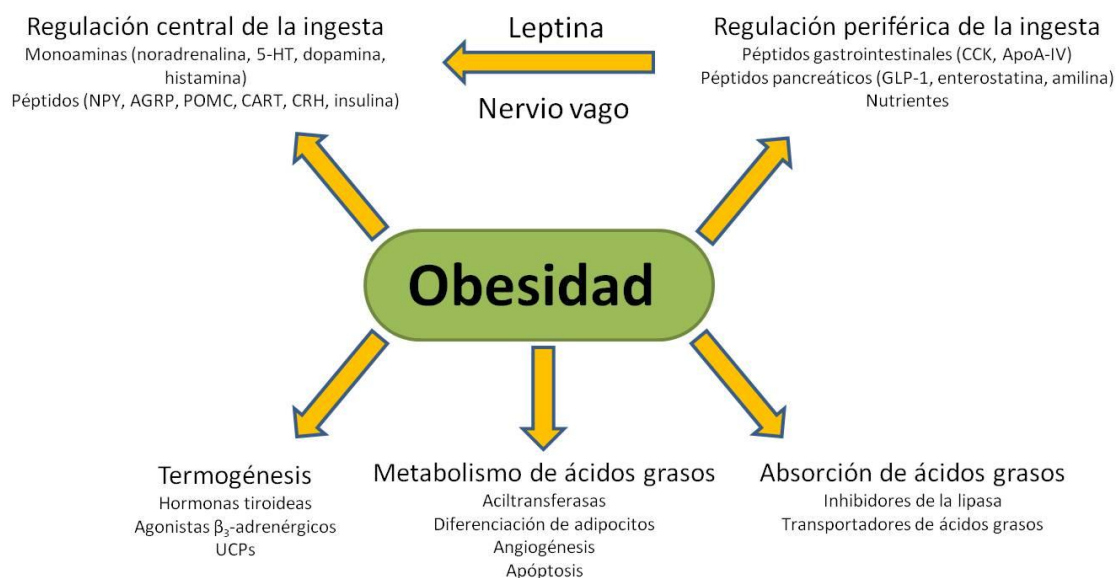


Figura 4: Diagrama de las distintas moléculas diana farmacológicas según la estrategia seguida para combatir la obesidad. Modificado de [17].

2.1.4 Cirugía bariátrica

La cirugía bariátrica es la opción más eficaz actualmente para el control del peso corporal en pacientes en los que las demás estrategias han fracasado y/o que debido a su peso corporal sufren enfermedades relacionadas con la obesidad como la diabetes tipo 2 o enfermedades cardiovasculares [18]. La cirugía bariátrica se puede clasificar en dos tipos, restrictiva y/o malabsortiva.

Los procedimientos restrictivos limitan el diámetro luminal del estómago, pero no reconducen el paso de la comida a través del tracto gastrointestinal mediante la eliminación de segmentos intestinales; se basan en la introducción de ciertos materiales exógenos o bandas como por ejemplo la banda gástrica ajustable por laparoscopia. Por otro lado, los procedimientos malabsortivos están diseñados para reducir el área de mucosa intestinal que se encarga de la absorción de los nutrientes mediante la gastrectomía parcial de esa zona [19].

La cirugía bariátrica no sólo produce una importante pérdida de peso del paciente, sino que mejora ostensiblemente el control del peso corporal a largo plazo. Diversos estudios realizados sobre pacientes sometidos a este tipo de cirugía han demostrado además otros tipos de beneficios al margen del peso corporal, como los efectos positivos sobre la diabetes, riesgo cardiovascular y calidad de vida, disminuyendo incluso el riesgo a padecer cáncer. El dato más positivo de este tipo de intervención es la baja tasa de mortalidad que presenta este procedimiento [20].

2.2 Enfermedades asociadas

2.2.1 Incremento de tejido adiposo corporal

Existen un elevado número de complicaciones médicas severas relacionadas con el incremento excesivo de tejido adiposo blanco que conlleva la obesidad. Estas complicaciones afectan en mayor o menor medida tanto a la calidad de vida como a la tasa de mortalidad prematura de los individuos que las padecen. El síndrome coronario agudo, la diabetes tipo 2, hipertensión, síndrome respiratorio, dislipemia, síndrome metabólico, esteatosis hepática o incluso ciertos tipos de cáncer son sólo un ejemplo de la larga lista de enfermedades directa o indirectamente relacionadas con la obesidad (figura 5) [21-23].

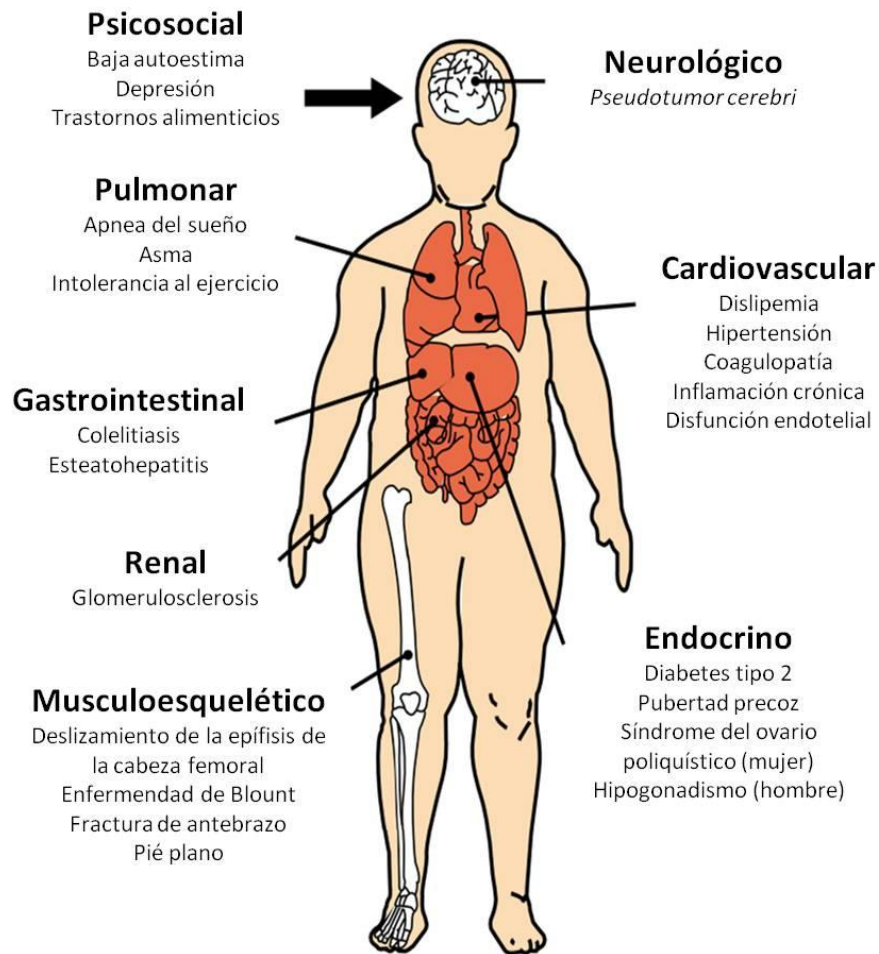


Figura 5: Conjunto de complicaciones que pueden surgir como producto del incremento de tejido adiposo corporal. Modificada de [24]

La obesidad se caracteriza por presentar elevados niveles de insulina plasmática en ayuno y una respuesta exagerada a la sobrecarga oral de glucosa. La adiposidad general y la distribución de los depósitos de tejido adiposo corporal influyen en el metabolismo de la glucosa a través de una serie de mecanismos independientes pero aditivos. A medida que aumenta el peso corporal también se observa un incremento progresivo de los niveles medidos de glucosa e insulina tras la prueba de sobrecarga oral de glucosa, con una correlación positiva entre la adiposidad abdominal o central y la resistencia a insulina.

La resistencia a la insulina conlleva la inhibición del efecto antilipolítico de la insulina en el tejido adiposo, lo que resulta en un incremento de los ácidos grasos libres (FFAs) liberados en especial por los adipocitos del tejido adiposo visceral al sistema porta hepático. El incremento de FFAs en el hígado reduce la respuesta de este órgano a la insulina plasmática activando su programa de gluconeogénesis e incrementando la liberación de glucosa hepática, lo que contribuye a los niveles de

glucosa tan elevados observados en obesidad. La falta de acción de la insulina sobre el hígado induce como respuesta un incremento en la liberación de la misma; así los niveles muy elevados de insulina plasmática terminan por ocasionar una regulación negativa de sus receptores en los tejidos diana. La resistencia a la insulina no se produce sólo en los adipocitos, el mismo proceso se produce también en el tejido muscular esquelético, por lo que el proceso se vuelve sistémico [5].

En la actualidad, la obesidad y la diabetes se considera que están estrechamente relacionadas a través de un estado de inflamación crónica sistémica y de bajo grado. Se ha visto, que los niveles circulantes de varios marcadores de inflamación (Ej. IL-6, haptoglobina o la proteína C-reactiva) se encuentran muy elevados en obesidad y reducidos en pacientes normopeso. La hipótesis más plausible es que los factores inflamatorios derivados del tejido adiposo podrían ser los responsables de la resistencia a la insulina y otras enfermedades asociadas a este estado como el síndrome metabólico [25].

2.2.2 Ausencia de ejercicio físico

El ejercicio físico se puede definir como cualquier actividad física que implique un gasto energético del individuo. A nivel fisiológico el término ejercicio incluye el conjunto de respuestas adaptativas que se producen en el organismo durante el esfuerzo físico [26]. Las adaptaciones al ejercicio ocurren en casi todos los órganos y sistemas, como el respiratorio, neuronal, endocrino, músculo-esquelético o gastrointestinal. Estas adaptaciones confieren importantes beneficios como resistencia a padecer enfermedades cardiovasculares, diabetes, fibromialgia, osteoporosis, depresión e incluso obesidad, por lo que también protegería frente a las enfermedades asociadas a esta (figura 6) [27-29].

Las bases del efecto protector del ejercicio están relacionadas directamente con la fisiología propia del tejido muscular esquelético. La actividad muscular es un potente estimulador del metabolismo y la síntesis proteica; confiriendo al músculo la capacidad de adaptarse continuamente a las actividades que realice el individuo produciéndose desde hipertrofia muscular a cambios en el tipo de fibras, resultando en un mayor rendimiento energético al ser un tejido capaz de modificar su preferencia por una fuente energética u otra.

La inactividad física induce el desarrollo de fibras más rápidas que consumen preferentemente glucosa en detrimento de fibras lentas que presentan un metabolismo más oxidativo; esta dinámica produce cambios en el metabolismo hepático con un incremento en la gluconeogénesis. Por otro lado, el músculo se convierte en un tejido capaz de realizar movimientos de gran intensidad y de corta

duración a expensas de fatigarse más rápido. Estos cambios en el tipo de fibras y en la fisiología del músculo influyen de manera determinante en el metabolismo energético general, y en especial en el desarrollo de enfermedades relacionadas con la señalización de la insulina y el metabolismo de la glucosa y ácidos grasos [30].

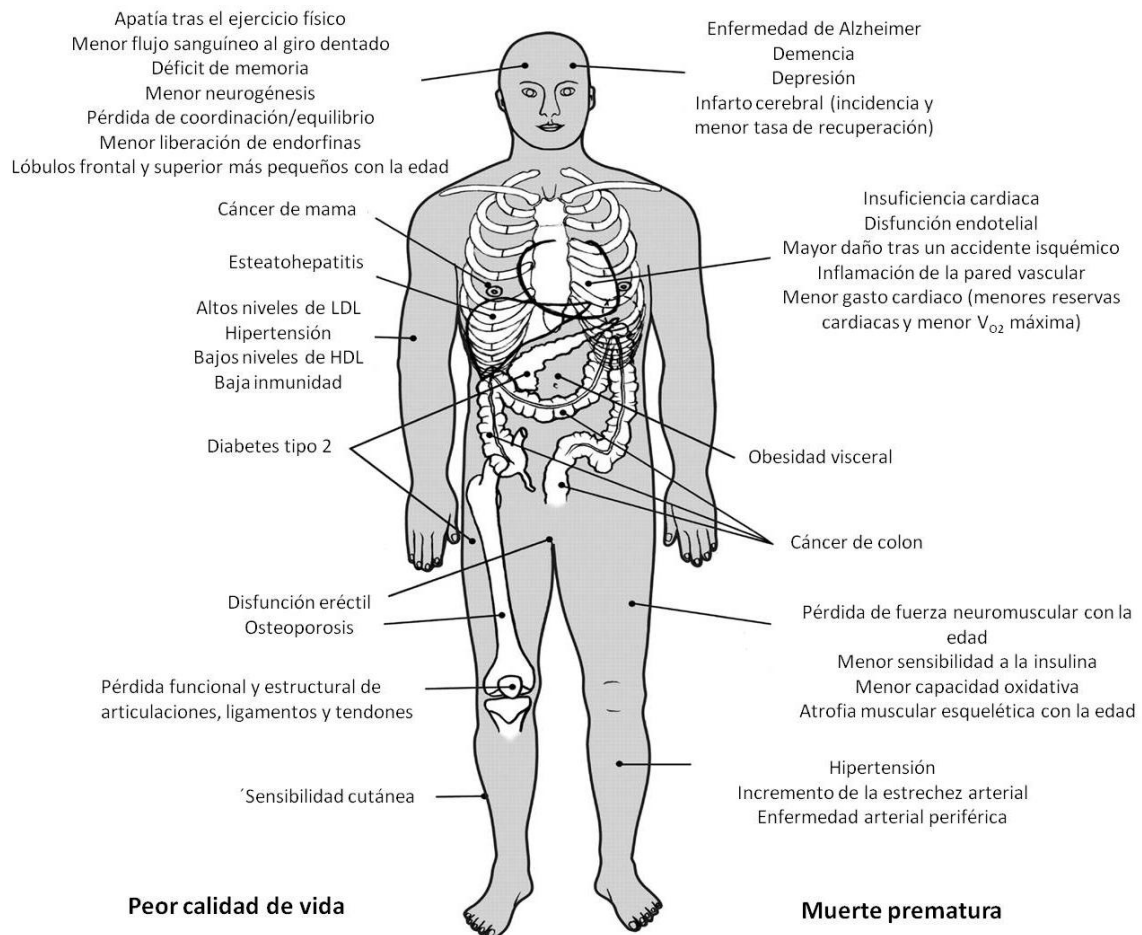


Figura 6: Algunas consecuencias observadas por el efecto de la inactividad física. Modificada de [26].

Recientemente se ha propuesto la hipótesis de que la inactividad física podría conducir a un incremento en la adiposidad central, en especial de tejido adiposo visceral, produciéndose una infiltración de macrófagos que activarían una serie de rutas que derivarían en un estado de inflamación crónica sistémica y que en última instancia sería la causante de la mayoría de enfermedades relacionadas con la ausencia de ejercicio físico (figura 7) [31]. Con respecto a este tema, el tejido muscular esquelético se ha destacado como un potente sistema de defensa frente a la inflamación a través de la secreción de una serie de proteínas (como las proteínas de shock térmico) con efectos antiinflamatorios, además de jugar un papel fundamental

en la señalización que se produce durante la inflamación sistémica así como en la modulación de la respuesta inflamatoria.

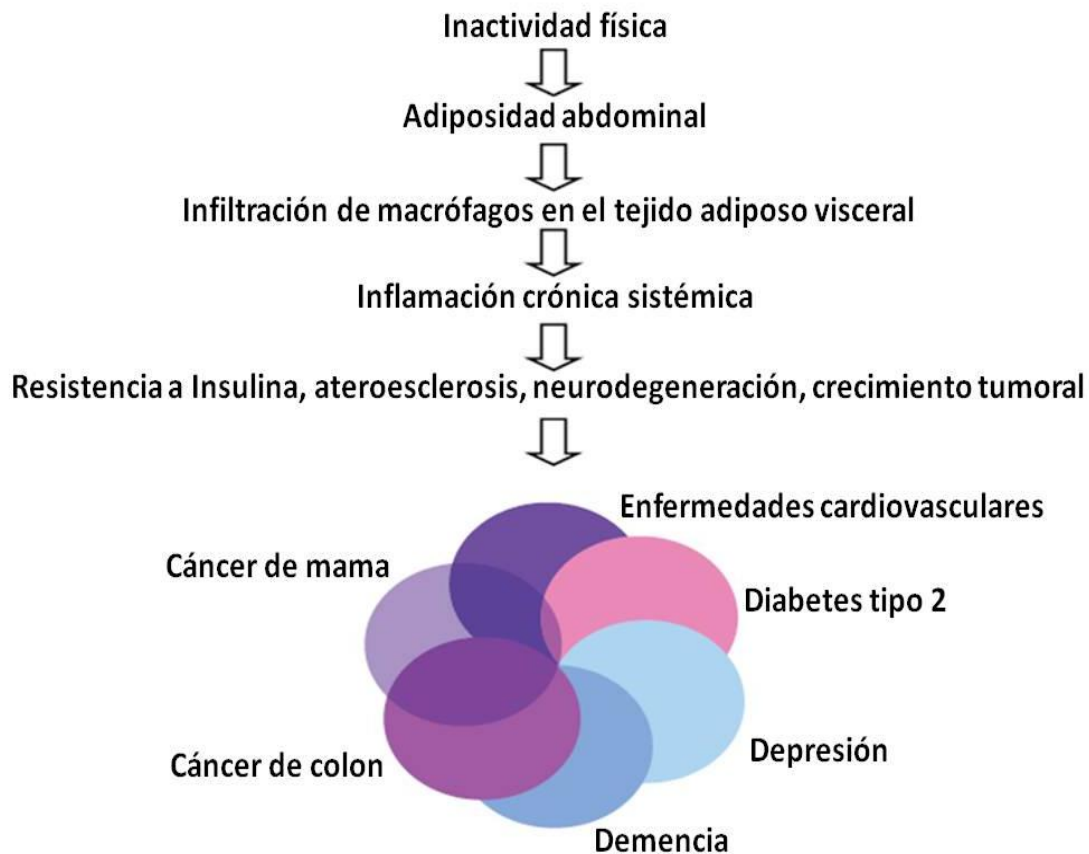


Figura 7: Esquema de los procesos inflamatorios derivados de la inactividad física. Modificada de [31].

Actualmente se desconocen los mecanismos concretos responsables de los efectos beneficiosos producidos por el ejercicio físico; se cree que el mecanismo fundamental se encuentra en la comunicación bidireccional que existe entre el tejido muscular esquelético y órganos periféricos como el tejido adiposo. Así, en los últimos años se ha abierto un nuevo paradigma al demostrar que el músculo puede comportarse como un órgano endocrino secretando una serie de proteínas denominadas mioquinas. Estas proteínas de señalización formarían parte del sistema de comunicación entre el tejido muscular y otros tejidos periféricos y/o centrales, y estarían relacionadas directamente con los efectos del ejercicio. Ante esta nueva situación, el estudio de estas proteínas en los próximos años será fundamental para entender muchas de las enfermedades derivadas de la ausencia del ejercicio físico y su papel en la obesidad y trastornos relacionados [32].

3. Regulación de la ingesta

La movilización y almacenamiento de energía en forma de ácidos grasos o glucógeno es un proceso esencial y dinámico que permite al organismo poder responder rápidamente a la demanda energética y que se regula de una manera compleja con el fin de asegurar un estado de homeostasis energética correcto. Esta regulación se lleva a cabo por un lado 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, con lo cual favorecen un balance energético negativo [33].

El cerebro recibe continuamente información mediante una serie de receptores que monitorizan las reservas energéticas presentes en los órganos críticos y su movilización a través del torrente sanguíneo, lo que asegura un control central de las necesidades energéticas de cada tejido. Esta información es aportada por ciertos órganos periféricos implicados en la homeostasis energética, como el estómago o el tejido adiposo, a través de un complejo sistema de señales liberadas a la sangre características de cada uno de los órganos implicados [34].

En términos generales la ingesta se regula por un lado a través del sistema nervioso central (SNC), siendo el hipotálamo la región fundamental; y por otro lado a través del complejo sistema de señales periféricas que informan al sistema nervioso central (figura 8).

3.1 Sistema nervioso central: El hipotálamo

El área principal y más importante del cerebro implicada en la regulación del apetito y en la homeostasis energética es el hipotálamo, aunque también se encuentran implicadas regiones del tronco cerebral y del cerebelo [35]. El hipotálamo consiste en una pequeña área de la región mediobasal del cerebro localizada justo debajo del tálamo, que se divide en varios núcleos interconectados: el núcleo arcuato, el núcleo paraventricular, el área hipotalámica lateral, el núcleo ventromedial y el núcleo dorsomedial.

Esta región del cerebro comenzó a captar la atención de los investigadores tras los datos clínicos observados en pacientes con síndrome de Fröhlich, los cuales presentaban una serie de tumores pituitarios asociados a hipogonadismo y a un exceso de tejido adiposo subcutáneo [36]. Más tarde, mediante una serie de experimentos en los que se destruían ciertos núcleos del hipotálamo, se profundizó en el papel regulador de la ingesta de este órgano. Se comprobó como las lesiones en el núcleo ventromedial producían un incremento de la ingesta y obesidad, mientras que las lesiones en el área hipotalámica lateral producían una disminución de la ingesta y

anorexia. Por lo que se empezó a hablar de un “modelo de doble centro” compuesto por un “centro de la saciedad” y un “centro del hambre” [37].

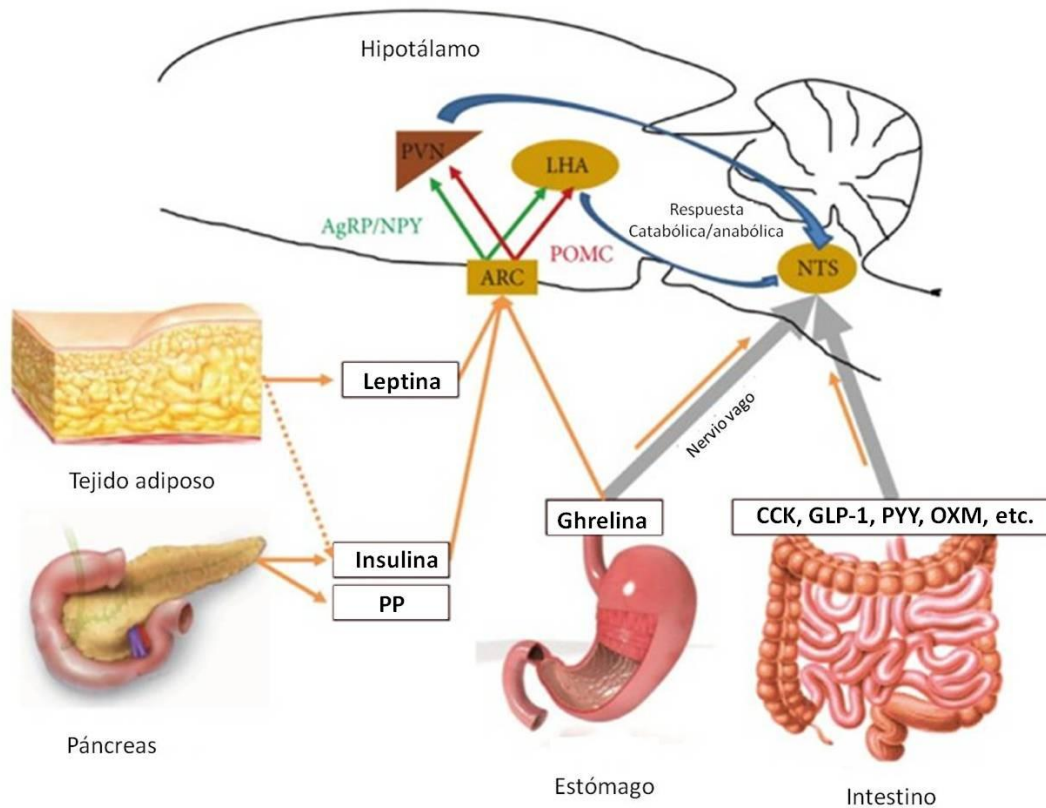


Figura 8: Representación esquemática de los múltiples sistemas que regulan el apetito. Modificada de [38].

Anatómicamente el **núcleo arcuato** (ARC) se sitúa en una zona donde la barrera hematoencefálica es más débil, permitiendo el paso de hormonas y nutrientes, este hecho convierte a este núcleo en el área receptora principal de las señales metabólicas periféricas. El núcleo arcuato se caracteriza por poseer dos circuitos neuronales opuestos, un circuito orexigénico, que secretan los neuropeptidos Y (NPY) y la proteína r-agouti (AgRP); y un circuito anorexigénico, que expresan neuropéptidos como la proopiomelanocortina (POMC) y el transcrito regulado por cocaína y anfetamina (CART) [38].

El **núcleo dorsomedial** (DMN) recibe numerosas terminaciones nerviosas procedentes de las neuronas del núcleo arcuato y está implicado en diversos mecanismos de regulación del sueño y de los ritmos circadianos, así como de la modulación en la secreción de gonadotropinas. A pesar de que se ha comprobado que

lesiones en esta región producían un aumento en la ingesta, todavía no se conocen bien los mecanismos que implican a este núcleo en la homeostasis energética [39].

Las neuronas del **núcleo paraventricular** (PVN) secretan una serie de neuropéptidos que estimulan una respuesta catabólica, como es el caso de la hormona liberadora de corticotropina (CRH), la somatostatina, vasopresina o la oxitocina. Este núcleo libera estas señales a través del sistema nervioso simpático en órganos periféricos como el hígado o el tejido adiposo, estimulando la oxidación de ácidos grasos y la lipólisis. [40].

El **núcleo ventromedial** (VMN) presenta neuronas sensibles a la glucosa y a la leptina, secretando el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), que tiene carácter anorexigénico. En términos generales, este núcleo se considera un área imprescindible en la generación de la sensación de saciedad y en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa.

El **área hipofisaria lateral** presenta dos poblaciones neuronales que secretan neuropéptidos orexigénicos, una población que expresa la hormona concentradora de melanina (MCH) y otra población que expresan las hipocretinas. Esta área se considera “el centro del hambre” y está implicada en la ingesta de alimentos, así como en la sensibilidad a la glucosa y en la regulación de los ciclos del sueño [38].

3.2 Órganos periféricos

3.2.1 Tracto gastrointestinal

El tracto gastrointestinal es considerado el órgano endocrino más grande del cuerpo, se expresan más de 30 genes hormonales y se producen más de 100 péptidos bioactivos. La anticipación y la presencia de comida en el estómago e intestino delgado estimulan la secreción de muchas de estas hormonas a través de estímulos mecánicos y químicos, por ejemplo, la distensión del estómago produce una serie de señales que inducen la sensación de saciedad. En general se considera que el tracto gastrointestinal se encarga de la regulación del apetito a nivel periférico [41].

El tracto gastrointestinal secretor está dividido en varias zonas y glándulas accesorias con funciones tanto exocrinas como endocrinas y que regulan la ingesta de forma periférica. Sus zonas endocrinas principales son el estómago y ciertas regiones del intestino delgado; y las glándulas implicadas son el páncreas y el hígado [38, 42].

3.2.2 Páncreas

El páncreas es una glándula mixta compuesta por elementos de naturaleza exocrina (98 %) y endocrina. La porción endocrina del páncreas está formada por una serie de cúmulos celulares denominados islotes de Langerhans, conformados principalmente por tres tipos celulares distintos [43]:

- Células alfa, caracterizadas por expresar y secretar glucagón.
- Células beta, secretoras de insulina y amilina.
- Células delta, que secretan somatostatina.

A parte de estos tres tipos, en los islotes de Langerhans se encuentran otros tipos celulares como las células PP, productoras del polipéptido pancreático (PP), hormona que controla la secreción exocrina del páncreas y que en los últimos años ha sido objetivo de estudio debido a su posible acción anorexigénica a través del nervio vago [44].

La insulina se secreta inmediatamente tras la ingesta de alimentos y está implicada en la regulación del balance energético a largo plazo. Se caracteriza por su capacidad de inducir la captación de glucosa circulante en los tejidos sensibles a esta hormona. Sin embargo, la insulina también actúa como señal anorexigénica a nivel del SNC, se sabe que se expresan receptores de insulina en distintas partes del cerebro, en especial en los núcleos hipotalámicos, y se ha comprobado en estudios donde se realizaban inyecciones intrahipotalámicas de insulina en el PVN, que producían una disminución en la ingesta y en el peso corporal [45]. La insulina penetra en el SNC en un proceso de saturación, indicativo de la existencia de un transportador que podría ser el propio receptor o alguna otra molécula relacionada [42].

El glucagón es una hormona pancreática que también se secreta en la región distal del intestino delgado. Su función principal es opuesta a la insulina, produciendo un aumento de los niveles de glucosa en sangre estimulando la gluconeogénesis en el hígado. También se ha demostrado que el bloqueo de la acción del glucógeno incrementa el consumo de alimentos [41].

3.2.3 Estómago

El estómago es un reservorio del tracto digestivo en el que se almacena la comida temporalmente a la vez que se inicia el proceso de digestión. Este órgano está compuesto de una serie de glándulas tanto exocrinas para la función digestiva, como endocrinas para la función de regulación de la ingesta. Esta última función ha sido descubierta en los últimos años y cada vez es mejor conocida [35].

La ghrelina es un péptido producido y secretado por el fundus del estómago, así como en otros tejidos en menor medida. Fue aislado originariamente del estómago de rata como un ligando endógeno del receptor de secretagogos de la hormona de crecimiento (GHS-R) y se ha demostrado que posee una acción liberadora de hormona de crecimiento (GH). La administración de ghrelina a nivel central y periférico estimula la ingesta y el aumento de peso corporal, además se ha comprobado como los niveles de esta proteína en plasma están elevados en ayuno. Por tanto, la ghrelina está considerada fisiológicamente como una hormona orexigénica [38].

Si bien se conocen muchos péptidos anorexigénicos secretados por el tracto gastrointestinal (incluido el estómago), como la colecistoquinina (CCK), el péptido tirosina-tirosina (PYY) o la oxintomodulina [34]; hasta ahora sólo se conoce la ghrelina como péptido estimulador de la ingesta (tabla 3).

Hormona gastrointestinal	Efecto sobre la ingesta
Colecistoquinina	↓
Amilina	↓
GLP-1	↓
PYY	↓
APO-AIV	↓
Enterostatina	↓
Oxyntomodulina	↓
Leptina gástrica	↓
Ghrelina	↑

Tabla 3: Distintas hormonas gastrointestinales y sus efectos sobre la ingesta. Modificada de [46].

La función endocrina de la ghrelina se produce tanto a nivel central como periférico en una serie de tejidos que expresan el receptor de secretagogos de la hormona de crecimiento (GHS-R). Este receptor presenta dos variantes, GHS-R1a y GHS-R1b. El primero es un receptor de tipo 1a acoplado a proteína G con siete dominios transmembrana que juega un papel importante en la estimulación del apetito a nivel central y que es activado por ghrelina y por secretagogos de GH. Se expresa en diversas regiones del cerebro, en especial en los núcleos ARC, VMN y PVN del hipotálamo. En los tejidos periféricos, se puede encontrar expresado este receptor en el estómago, páncreas, intestino y tejido adiposo entre otros. Por otro lado, GHS-R1b es un receptor truncado que presenta sólo cinco regiones transmembrana y del que no

se conocen ni sus activadores ni si presenta algún tipo de función, aunque se ha postulado que podría dimerizar con GHS-R1a e inhibir su función [47].

3.2.4 Hígado

El hígado es el órgano más grande del cuerpo y supone alrededor del 2.5% del peso corporal total del individuo. Recibe aproximadamente el 25% de la circulación cardiaca a través de la vena porta, la cual conduce los nutrientes absorbidos por el tracto gastrointestinal y que lo comunica directamente con el tejido adiposo visceral [48]. Este órgano tiene numerosas funciones, como son el almacén de vitaminas y glucógeno, la síntesis de proteínas plasmáticas, y la función exocrina o desintoxicante. El hígado se compone en un 80% de un tipo celular específico denominado hepatocito, células altamente especializadas con múltiples funciones que van desde la síntesis de proteínas como la albúmina, metabolismo de la glucosa, síntesis de pigmentos biliares o el catabolismo de fármacos. Además de los hepatocitos, en el hígado también se encuentran las células de kupffer, que constituyen un sistema de macrófagos que forman parte del sistema fagocítico mononuclear [49].

El hígado es un órgano muy flexible en su función reguladora de la homeostasis de la glucosa, siendo el mayor productor de glucosa endógena a través de la glucogenólisis y la gluconeogénesis. Bajo condiciones de bajos aportes de glucosa exógena, por ejemplo durante las fases de ayuno, la energía necesaria para el funcionamiento de este órgano se obtiene mediante la oxidación de ácidos grasos. Por otro lado, el hígado es un órgano receptor de glucosa exógena, almacenándola en forma de glucógeno o transformada en ácidos grasos que pueden ser almacenados en el propio órgano o movilizados a otros tejidos como lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) [50].

Los hepatocitos tienen la capacidad de almacenar en su citoplasma tanto los ácidos grasos producidos por el propio hígado como los captados del torrente sanguíneo en forma de pequeñas gotas lipídicas. Cuando el ratio entre ácidos grasos incorporados frente a los ácidos grasos movilizados es mayor, surgen complicaciones como la esteatohepatitis no alcohólica. El origen mayoritario de los ácidos grasos incorporados por el hígado es el tejido adiposo visceral a través de la comunicación con la vena porta [51-53]; de hecho, el depósito visceral es considerado como un marcador eficaz para estimar la posibilidad de que un paciente obeso pueda desarrollar distintas complicaciones metabólicas relacionadas con esta enfermedad. Sin embargo otros autores afirman que la medición de la grasa intrahepática podría ser un marcador más fiable [54, 55].

Independientemente de las causas de la adiposidad del hígado, existe un consenso generalizado de que el hígado juega un papel muy importante en alteraciones metabólicas relacionadas con disfunciones en la homeostasis de la glucosa [56] y ya se empieza a hablar de ciertas funciones endocrinas por parte de este órgano gracias a los recientes descubrimientos de una serie de proteínas secretadas por los hepatocitos, que se denominaron hepatoquinas, y a las que se les atribuyen una serie de funciones relacionadas con la resistencia a la insulina y el control de la obesidad sobre los tejidos periféricos implicados en la homeostasis energética y sobre el propio hígado (tabla 4) [42].

Hepatoquinas	Efectos	
	Modelos animales o in vitro	Humanos
Angiopietina relacionada con la proteína 6	↑ Gasto energético	
	↓ Obesidad, esteohepatitis no alcohólica e inflamación subclínica	↑ Resistencia a insulina
Fetulina-A	↑ Obesidad, resistencia a insulina e inflamación subclínica	↑ Resistencia a insulina, esteohepatitis no alcohólica, inflamación subclínica, diabetes tipo 2 y enfermedades cardiovasculares
FGF-21	↑ Gasto energético	
	↓ Resistencia a insulina	↑ Obesidad, esteohepatitis no alcohólica y resistencia a insulina
Selenoproteína P	↑ Resistencia a insulina	↑ Resistencia a insulina e inflamación subclínica
Globulina fijadora de hormonas sexuales		↓ Obesidad, resistencia a insulina, esteohepatitis no alcohólica, inflamación subclínica, diabetes tipo 2 y enfermedades cardiovasculares
	↑ señalización y viabilidad de las hormonas sexuales	

Tabla 4: Algunas hepatoquinas caracterizadas junto con sus efectos observados tanto en la experimentación animal como humana. Modificada de [42].

La **fetulina-A** fue identificada en 1944 en el suero, siendo la proteína globular más abundante en el suero fetal bovino. También es conocida como glicoproteína α 2-Heremans-Schmid y hasta la fecha se creía que su expresión era exclusiva del hígado, lengua y placenta [57]. Esta proteína ha suscitado un gran interés para su estudio debido a que se ha demostrado que actúa como un inhibidor natural del receptor tirosina-quinasa de la insulina de hígado y músculo esquelético. La investigación con ratones deficientes para el gen que codifica la fetulina-A mostró que estos presentaban una mayor sensibilidad a la insulina y resistencia al aumento de peso inducido por la ingesta [58].

Los estudios sobre los polimorfismos del gen de fetuina-A han demostrado como esta proteína afecta a la acción de la insulina sobre los adipocitos [59] y se asocia con diabetes tipo 2 [60]. Recientemente se han visto que los niveles de fetuina A en el plasma humano se correlacionan con la esteohepatitis no alcohólica, intolerancia a la glucosa, resistencia a insulina, síndrome metabólico y aterosclerosis [61-63]. Finalmente se ha comprobado que la fetuina-A induce inflamación subclínica e inhibe la secreción de adiponectina [64].

Estos datos apoyan la teoría que presentan algunos autores de que la fetuina-A es la proteína más importante secretada por el hígado y que se encarga de regular la sensibilidad a insulina. El aumento en los niveles de glucosa y ácidos grasos saturados circulantes en procesos patológicos como la obesidad estimularía un incremento en la secreción de fetuina-A a la circulación, inhibiendo la señalización de insulina al unirse y bloquear los receptores de insulina en los tejidos diana, produciendo una resistencia a la misma. A su vez la fetuina-A actúa como proteína adaptadora para los ácidos grasos saturados, permitiendo que estos sean capaces de activar los receptores de tipo Toll 4 (TLR4) induciendo una respuesta inflamatoria tanto en adipocitos como en las células inmunes (figura 9) [42].

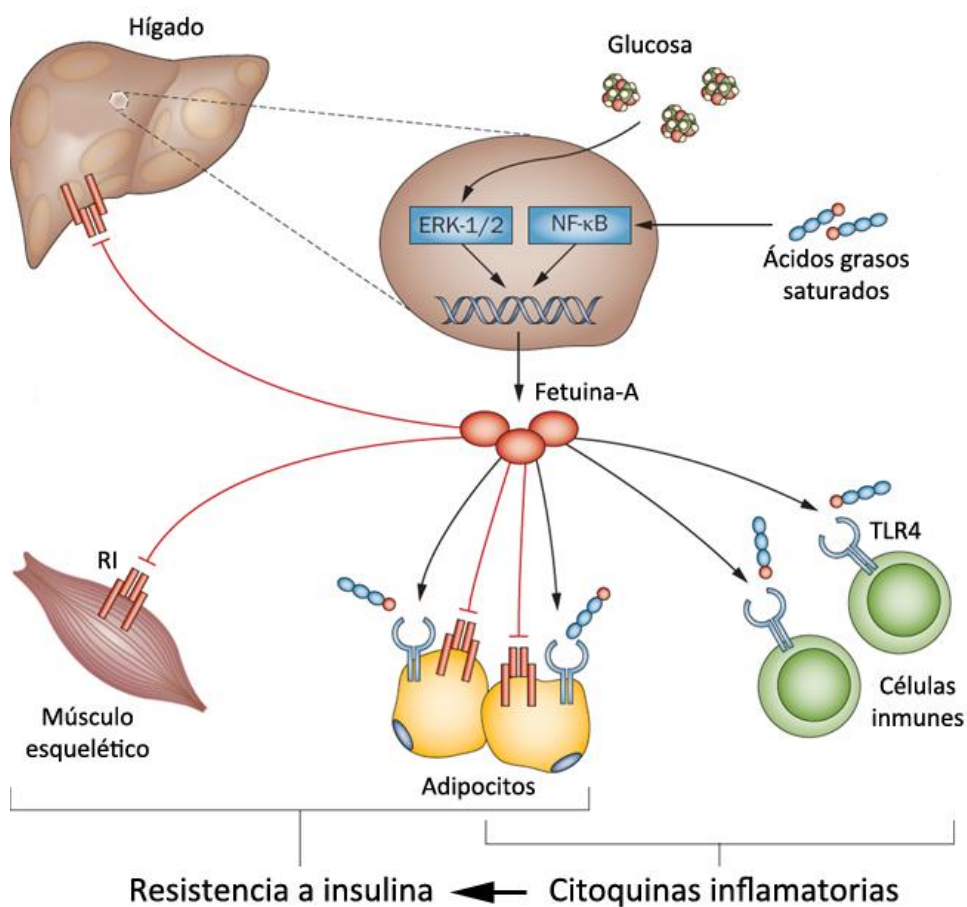


Figura 9: Modelo esquemático de la hipótesis de la resistencia a insulina inducida por fetuina-A. Modificado de [42].

4. Tejido adiposo

El tejido adiposo fue considerado durante mucho tiempo como el almacén energético del organismo, en donde se acumulaban los excedentes de energía consumidos y se movilizaban según la demanda. Sin embargo en esos años ya surgían voces que reclamaban un papel más activo de este tejido, llegando a postularse que podría funcionar a modo de órgano endocrino, sintetizando una serie de hormonas que podrían estar implicadas directamente en alteraciones relacionadas con la obesidad y sus comorbilidades [65]. El punto de inflexión para el tejido adiposo se produjo a raíz de la identificación del producto de una mutación, conocida desde el año 1950, que producía obesidad y diabetes tipo II en ratones homocigotos (ratones ob/ob). A esta proteína se le puso el nombre de leptina y supuso el comienzo del estudio del tejido adiposo como órgano endocrino [66].

En términos generales el tejido adiposo se puede clasificar en 3 tipos: El tejido adiposo blanco (TAB), el tejido adiposo pardo (TAP) y el tejido adiposo de la médula ósea (médula ósea amarilla); este último muy poco estudiado en endocrinología ya que su principal función es actuar como reservorio energético para el control de la hematopoyesis y la osteoblastogénesis [67].

4.1 Adipocitos

El tejido adiposo está principalmente compuesto por adipocitos, sin embargo existen otros tipos celulares minoritarios en este tejido como son los fibroblastos, células endoteliales, monocitos, macrófagos y preadipocitos. Estos tipos celulares adicionales componen lo que se conoce como células del estroma vascular [68]. Los adipocitos son el tipo celular principal y el que confiere a este tejido la mayoría de sus propiedades [69]. Hay diferentes tipos de adipocitos, que se clasifican en tres tipos principales: adipocitos blancos, marrones y beis. Los primeros son los componentes principales del tejido adiposo blanco, mientras que los adipocitos marrones son característicos del tejido adiposo pardo. Los adipocitos beis son un tipo de adipocito con características similares a los adipocitos marrones que se encuentran en el tejido adiposo blanco; es un tipo celular descubierto recientemente cuyo origen y funciones están aún poco definidas [70].

Hasta hace pocos años, los adipocitos blancos y marrones se consideraron como dos tipos celulares similares que derivaban de un precursor común. Sin embargo, estudios recientes demostraron que durante el desarrollo embrionario, las células del dermomiótoma central se diferenciaban en tres tipos tisulares distintos: dermis, músculo y adipocitos marrones. Cuando se estudiaron cultivos celulares de precursores de adipocitos marrones se comprobó que estas células expresaban una serie de genes que hasta entonces habían sido considerados como específicos de

células musculares, mientras que estos genes a su vez no se expresaban en los adipocitos blancos [71]. Más adelante, en estudios con ratones se confirmó que las células que expresaban el factor de transcripción miogénico 5 (*myf-5*) durante su desarrollo, podían derivar tanto en células musculares como en adipocitos marrones, pero nunca en adipocitos blancos. Por lo que se estableció la existencia de dos linajes celulares distintos y bien diferenciados: un linaje celular que daría lugar a los adipocitos blancos; y otro linaje, caracterizado por la expresión de *myf-5*, que daría lugar tanto a los precursores musculares como a los adipocitos marrones (figura 10) [72].

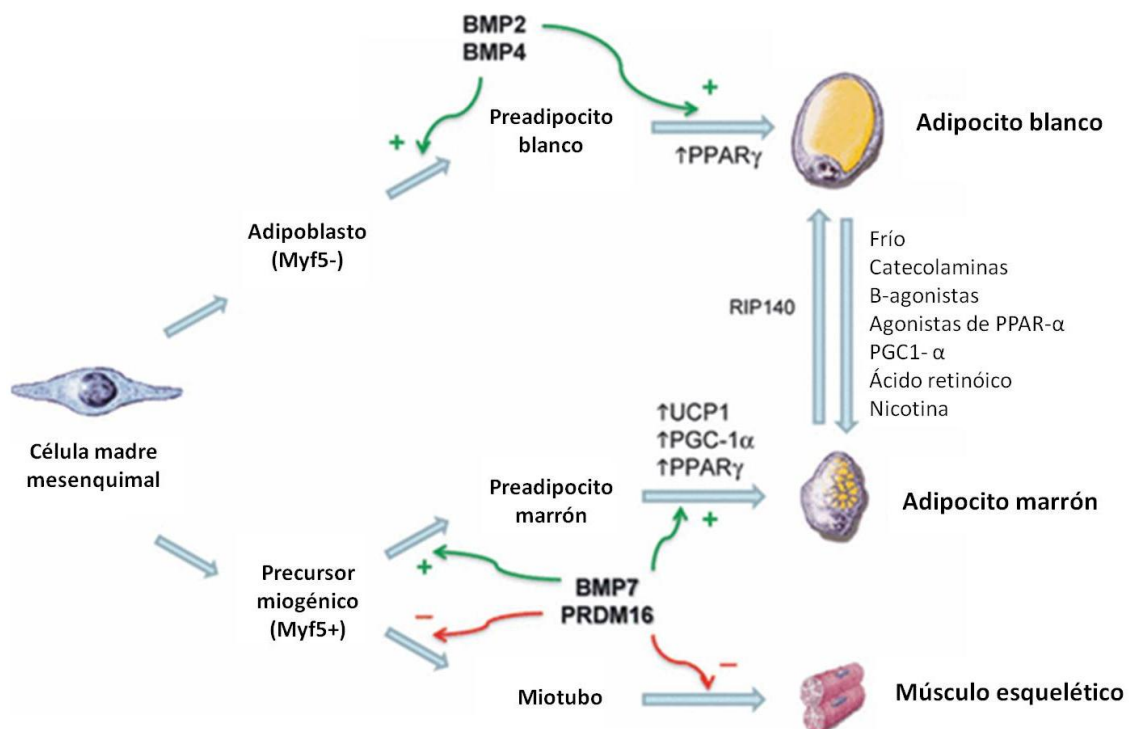


Figura 10: Esquema del proceso de diferenciación de los adipocitos blancos y marrones. Modificada de [72].

4.1.1 Adipocito blanco

El adipocito blanco, también llamado célula unilocular por la característica gota lipídica que ocupa la mayor parte de su citoplasma, es el único tipo celular especialmente adaptado para almacenar lípidos sin comprometer su integridad funcional; posee toda la maquinaria necesaria para sintetizar ácidos grasos, almacenar triglicéridos en periodos de abundancia energética y a movilizarlos mediante lipólisis en casos de déficit calórico [68]. Esta célula también presenta una importante función secretora, sintetizando hormonas y moléculas bioactivas, como la leptina y la adiponectina, que actúan tanto de forma autocrina/paracrina como endocrina para regular el tejido adiposo y el metabolismo sistémico. A parte de los adipocitos, las

células del estroma vascular también participan en la función endocrina del tejido adiposo, liberando al torrente sanguíneo péptidos como la omentina, visfatina, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) o la interleuquina-6 (IL-6) [73].

4.1.2 Adipocito marrón

El adipocito marrón, o célula multilocular, es el principal componente del TAP y se caracteriza por almacenar lípidos en pequeñas gotas a lo largo de su citoplasma, en el cual se encuentra una gran cantidad de mitocondrias, lo que confiere a esta célula el color marrón característico. Estas mitocondrias presentan una maquinaria modificada que usa los ácidos grasos almacenados para la generación de calor mediante la activación de la proteína desacopladora tipo 1 (UCP-1), exclusiva de este tipo celular; esto permite la termogénesis mediada por el sistema nervioso simpático. Así, la expresión de esta proteína está fuertemente inducida por la exposición al frío [74]. Los adipocitos marrones han suscitado un gran interés en los últimos años, debido a recientes descubrimientos sobre su posible papel en la regulación metabólica y su función endocrina en adultos [75].

4.1.3 Adipocito beis

Desde hace ya bastantes años se conoce la existencia de ciertas células, dentro del TAB, que expresan altos niveles de UCP-1 y que presentan, de manera similar a los adipocitos marrones, una morfología multilocular con gran cantidad de mitocondrias en su citoplasma [76]. Hace poco se descubrió que estas células provenían del mismo precursor que los adipocitos blancos, que no expresan myf-5; por lo que el desarrollo de este tipo celular estaría regulado de diferente manera que el de los adipocitos marrones. A estos adipocitos se les denominó adipocitos beis, y se considera que comparten funcionalidades metabólicas similares a la de los adipocitos marrones, sin embargo, tanto en su genética como en su origen celular difieren completamente [71].

Para explicar el origen de los adipocitos beis, el grupo de Spiegelman acuñó el término *browning* para referirse a un fenómeno de interconversión en el que los adipocitos blancos del TAB, en presencia de una serie de factores como el péptido FNDC5/irisina, verían activada la maquinaria genética que permitiría a estas células llevar a cabo la termogénesis y la adquisición de características similares a las de los adipocitos marrones [77]. Este grupo comprobó que la inducción de este fenómeno de *browning* podría servir de protección frente a la obesidad inducida por la dieta y la diabetes, e incluso sugirieron que la mayoría de depósitos de tejido adiposo pardo encontrados en humanos adultos podrían estar compuestos por adipocitos beis [78].

4.2 Tejido adiposo blanco

Además de sus funciones como aislante térmico y soporte estructural y mecánico, el TAB se ha definido tradicionalmente como el mayor almacén de energía del cuerpo. Durante periodos de incremento de la ingesta o de poca demanda energética, la energía sobrante es depositada en el TAB en forma de triglicéridos, mediado por enzimas lipogénicas claves. Sin embargo, en el caso contrario, con escasez de alimentos o de grandes necesidades energéticas, este tejido es capaz de liberar eficazmente sus reservas lipídicas para incrementar la disponibilidad energética en el organismo, ya que los adipocitos también contienen lipasas que rompen los triglicéridos en glicerol y ácidos grasos que son transportados por el torrente sanguíneo al hígado, músculo o TAP [79].

El TAB presenta una importante función endocrina de regulación de la homeostasis energética. Este tejido se divide en diversos depósitos localizados en diferentes zonas del organismo, presentando diferencias estructurales, de organización, tamaño celular y función biológica entre los distintos depósitos. La distribución del tejido adiposo parece ser un factor clave en el riesgo a desarrollar enfermedades relacionadas con la obesidad, más importante incluso que el total de tejido adiposo corporal de un individuo [80].

4.2.1 Localización

El TAB es uno de los tipos tisulares más abundantes del organismo, llegando a suponer más de la mitad del peso corporal en situaciones de obesidad [67]. Este tejido se encuentra localizado en diferentes regiones anatómicas en mayor o menor cantidad, y según su localización recibe distintos nombres: Los principales depósitos de tejido adiposo son el visceral (TAV) y el subcutáneo (TAS). El TAV se encuentra asociado al aparato digestivo, y dentro de este se pueden distinguir varios subtipos: el omental (TAVo), que se encuentra en contacto con el estómago; el mesentérico (TAVm), asociado al intestino delgado y colon; y una serie de depósitos periféricos como son el retroperitoneal (TAVr), rodeando a los riñones; y el gonadal (TAVg), unido al útero y ovarios en mujeres y al epidídimo y testículos en hombres [80]. El TAS se divide en tres depósitos principales que se denominan según su localización corporal: abdominal (TASa), gluteal (TASg) y femoral (TASf) (figura 11) [73].

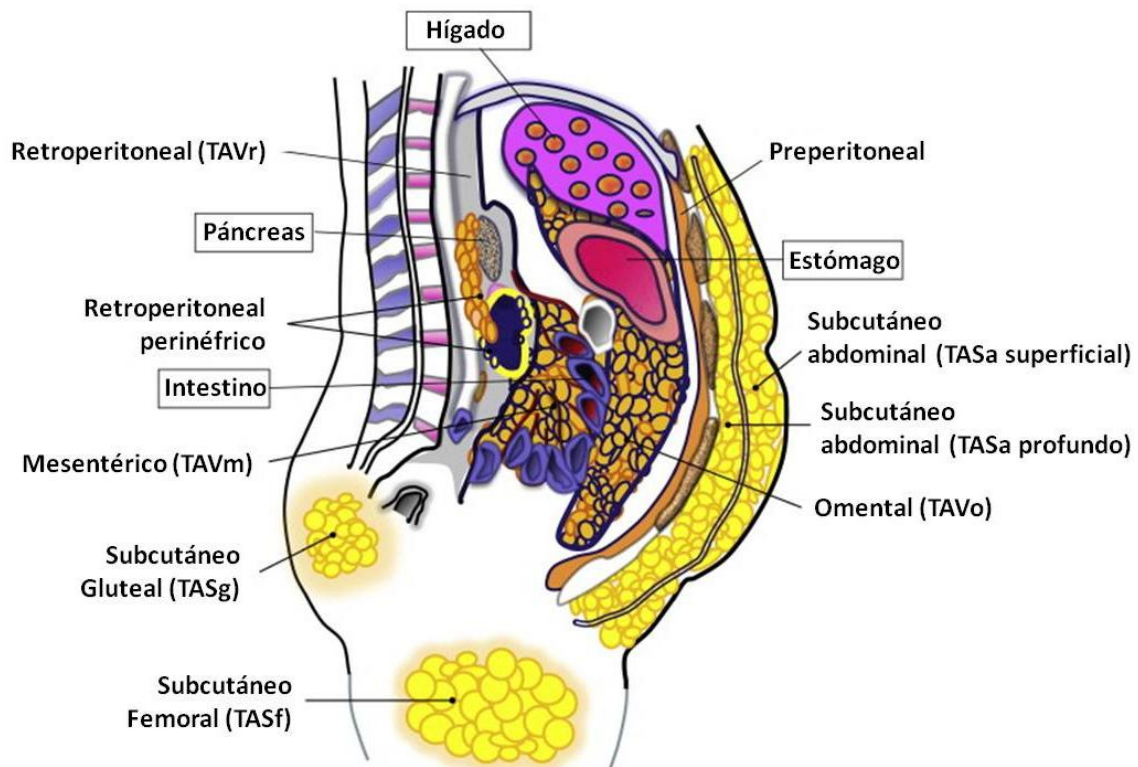


Figura 11: Representación esquemática de los distintos depósitos de tejido adiposo blanco humanos. Modificada de [73].

La distribución del TAB está determinada por el sexo, la edad y las diferencias poblacionales. Los hombres suelen acumular mayor cantidad de tejido adiposo en la zona abdominal, tanto TAV como TASa; mientras que en mujeres la mayor acumulación se suele dar en la región gluteofemoral (TASg y TASf). Se cree que este dimorfismo sexual viene determinado por las hormonas sexuales esteroideas [81], aunque los mecanismos que regulan la distribución del tejido adiposo son poco conocidos. Con respecto a las diferencias poblacionales, los caucásicos presentan un menor índice de obesidad que el resto de poblaciones. En EUA los afroamericanos e hispanos presentan una menor cantidad de TAV, mientras que las poblaciones de asia del sur presentan una mayor adiposidad central con respecto a la caucásica. Atendiendo a la edad, en general, la adiposidad central (TAV y TASa) se incrementa con los años [73].

Metabólicamente los distintos depósitos de tejido adiposo se comportan de manera diferente según su localización. Actualmente se sabe que el incremento en el TAV está asociado a un aumento en el riesgo de padecer enfermedades asociadas con la obesidad y existe una correlación directa entre los niveles de adiposidad y los niveles de resistencia a la insulina. Por otro lado el TAS, en especial el TASg y TASf, protege frente a los efectos lipotóxicos del almacenamiento a corto y largo plazo de triglicéridos. A nivel celular, los adipocitos del TAV son lipolíticamente más activos y

presentan una mayor cantidad de mitocondrias que los adipocitos del TAS [80]. Con respecto a las células del estroma vascular, se ha comprobado cómo, tanto en su composición como en su funcionalidad, estos depósitos difieren enormemente entre ellos; y los preadipocitos del TAS poseen una mayor capacidad de diferenciación que los del TAV, lo que sugiere una mayor plasticidad de este tipo tisular concreto [82].

Por otro lado, el TAVg se encuentra fuertemente regulado por las hormonas sexuales y existe una relación directa con la funcionalidad del aparato reproductor [80, 83].

4.2.2 TAB como órgano endocrino

El TAB es un órgano endocrino complejo y altamente activo que contiene la maquinaria metabólica necesaria para la comunicación con órganos distantes, incluido el SNC. Actualmente se conocen una amplia variedad de péptidos bioactivos secretados por este tejido, conocidos como adipoquinas, que actúan tanto a nivel local (función autocrina/paracrina) como a nivel sistémico (función endocrina) (figura 12). Además el TAB expresa numerosos receptores que le permiten responder a las señales aferentes procedentes de los sistemas hormonales tradicionales y del SNC [84].

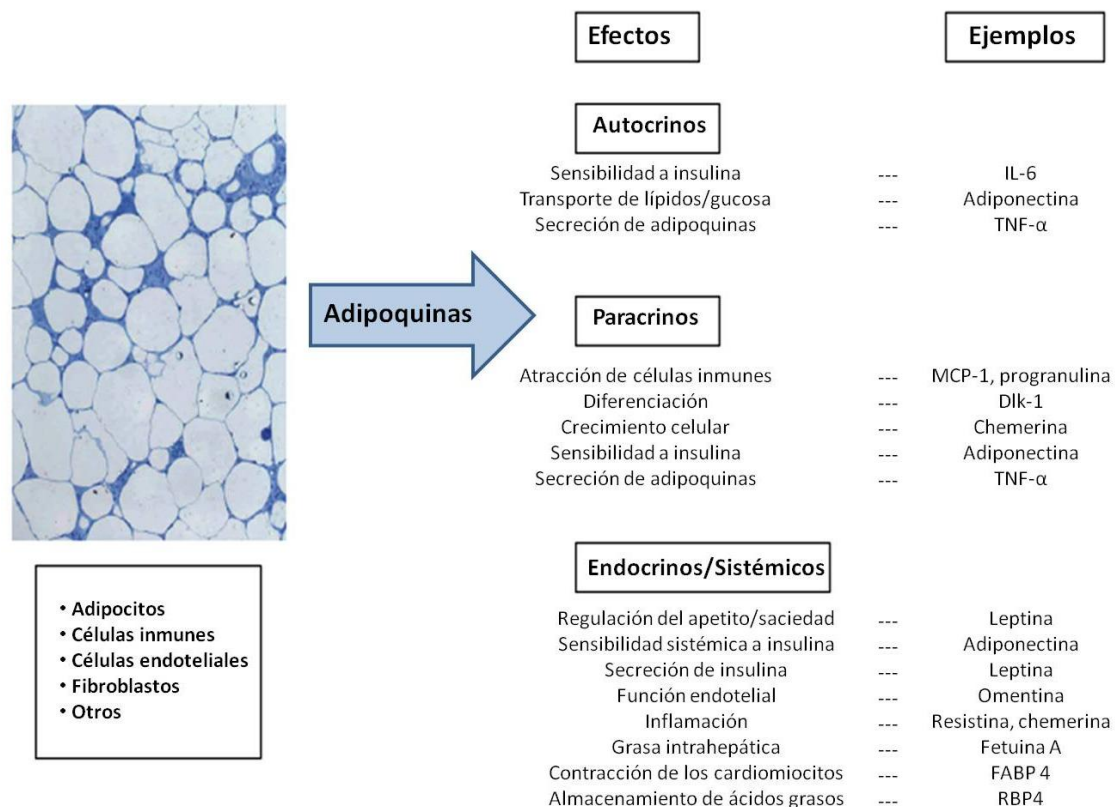


Figura 12: Diversos efectos de algunas de las adipoquinas conocidas. Modificada de [85].

Durante las últimas dos décadas, los avances en las investigaciones sobre obesidad han dado lugar al descubrimiento de más de 600 adipoquinas. Estas proteínas juegan importantes papeles en la regulación del apetito y el control de la saciedad, distribución del tejido adiposo, sensibilidad y secreción de insulina, gasto energético, inflamación, presión arterial, hemostasis y funciones endoteliales. De forma autocrina y paracrina, las adipoquinas contribuyen a la regulación de la adipogénesis, la infiltración de células inmunitarias en el tejido adiposo, el metabolismo de los adipocitos y su función. Pero más importantes son sus efectos sistémicos sobre otros órganos del cuerpo, como el cerebro, hígado, músculo, sistema vascular, corazón y células β pancreáticas. Los patrones de secreción de las adipoquinas reflejan la función del tejido adiposo y suponen unos biomarcadores muy importantes que determinan el riesgo de un individuo a padecer enfermedades metabólicas y/o cardiovasculares relacionadas con la obesidad [85].

4.2.2.1 Leptina

El descubrimiento de la leptina en 1994 [66] y de su receptor un año más tarde [86], supuso un punto de inflexión en los estudios que hasta entonces se habían venido realizando en la regulación de la ingesta.

Esta proteína es sintetizada y liberada por los adipocitos blancos (y en menor medida los marrones), pero aunque es característica, no es exclusiva del tejido adiposo; varios tejidos como el muscular esquelético, placenta y estómago la expresan y secretan [46].

El efecto metabólico de la leptina está ampliamente documentado, los niveles plasmáticos de esta proteína aumentan en proporción a la cantidad de tejido adiposo corporal y puede ser usado como biomarcador de adiposidad. La leptina penetra la barrera hematoencefálica y es reconocida por los receptores expresados en las neuronas del hipotálamo, en especial las del núcleo arcuato. La activación de estos receptores induce una reducción en la ingesta y mejora el gasto energético [38]. Si bien los tratamientos de casos de obesidad debida a deficiencia de esta proteína mediante la administración de leptina han resultado exitosos, en los casos comunes de obesidad se ha visto como los niveles circulantes de leptina se encuentran muy elevados, produciéndose un fenómeno de resistencia a esta hormona. Los mecanismos que llevan a esta resistencia son aún poco conocidos, y algunos autores sugieren que podrían estar relacionada con un fallo en la señalización o en el paso de la leptina a través de la barrera hematoencefálica [84]. Otros efectos endocrinos importantes de la leptina incluyen la regulación de la función inmune, hematopoyesis, angiogénesis y osteogénesis.

El receptor de leptina (LEPR) es miembro de la familia de receptores de citoquina de clase I con un único dominio transmembrana. Hasta el momento se han identificado varias isoformas del mismo con variaciones en la longitud del dominio intracelular e incluso se conoce la existencia de una forma secretada sin los dominios transmembrana e intracelular [87]. La isoforma que presenta el dominio más largo es considerada la única forma activa y se expresa en el sistema nervioso central, preferentemente en los centros aferentes de la saciedad en el hipotálamo. LEPR también se expresa en tejidos periféricos como el tejido adiposo, muscular, células beta pancreáticas e hígado; lo que indica la importancia de la leptina como hormona tanto endocrina como autocrina/paracrina en la regulación del metabolismo energético [88].

4.2.2.2 Adiponectina

La adiponectina es una proteína de 30 kDa descubierta en 1995 simultáneamente por varios grupos. La adiponectina se expresa casi exclusivamente en los adipocitos y se secreta al torrente sanguíneo, en donde circula en elevadas concentraciones (casi el 0.01% de las proteínas plasmáticas totales) [89].

La localización de los depósitos de tejido adiposo influye de manera diferencial a las concentraciones de adiponectina circulante. La secreción de esta proteína decrece al incrementarse la adiposidad central, sin embargo, altos niveles de adiposidad en el TAS están asociados a altas concentraciones de adiponectina. Además se ha observado una relación inversa entre los niveles de esta adipoquina y la presencia de intolerancia a glucosa y diabetes tipo 2, incluso con la propensión a desarrollar estas enfermedades [90].

Desde el descubrimiento de esta proteína, se le han ido atribuyendo cada vez más funciones. La adiponectina mejora la sensibilidad periférica a la insulina y posee una acción antiinflamatoria y antiapoptótica en diferentes tipos celulares. Esta proteína promueve la funcionalidad y la supervivencia celular de las células beta del páncreas, encargadas de secretar insulina, y presenta también una acción a nivel central, estimulando el aumento de gasto energético y la pérdida de peso [85].

4.2.2.3 Otras adipoquinas

Las adipoquinas vaspina (secretada por las células del estroma vascular) y visfatina (producida por los adipocitos) presentan funciones de sensibilización a la insulina y efectos miméticos a esta respectivamente. Se ha comprobado que los niveles de estas dos proteínas estaban elevados en pacientes con diabetes tipo 2, tanto en obesos como en no obesos. Los niveles circulantes de vaspina y visfatina se correlacionan con los de IL-6 y la presencia de estas 3 adipoquinas se asocia positivamente con el índice

de masa corporal, el índice HOMA-IR (modelo homeostático de evaluación de la resistencia a insulina), el porcentaje de la hemoglobina glucosilada HbA1c y los niveles de triglicéridos. Estos datos sugieren que estas proteínas pueden jugar un papel importante en los fenómenos de resistencia a la insulina y la diabetes tipo 2 [91].

La resistina es una adipoquina descubierta en 2001 que se expresa en los adipocitos blancos de ratones y en los macrófagos y monocitos del EV en humanos. Esta proteína comparte tan sólo un 64% de homología entre ambas especies y no está claro que las funciones que se le ha atribuido a esta adipoquina en ratón sean equivalentes en humanos. En los estudios realizados en ratones, se vio que esta proteína se encontraba elevada tanto en la obesidad inducida por la dieta como en los modelos de obesidad genética y diabetes (ob/ob y db/db respectivamente). Al administrar exógenamente resistina se vio que disminuía la sensibilidad a la insulina, mientras que las concentraciones de colesterol y triglicéridos se vieron incrementadas. También se comprobó que la expresión de esta proteína en el TAV es 15 veces mayor que en el TAS [84]. Algunos autores han considerado a esta proteína como un mediador de la resistencia a la insulina y de las disfunciones metabólicas [92, 93], sin embargo otros autores no apoyan que esta adipoquina se encargue de regular la acción de la insulina [94, 95].

A pesar de la controversia generada sobre la acción de esta proteína, recientemente se ha asociado su presencia en humanos con los niveles de obesidad y resistencia a insulina; así como en el desarrollo y progresión de la aterosclerosis y enfermedades cardiovasculares [96].

4.3 Tejido adiposo pardo

Desde hace ya bastantes años se estableció que el TAP estaba presente de manera activa en humanos recién nacidos y que este tejido se encargaba del mantenimiento de la temperatura corporal del neonato a través de la generación de calor. Este proceso de termogénesis era posible gracias al desacoplamiento de la cadena de transporte de electrones de la membrana de las mitocondrias de los adipocitos marrones gracias a una serie de proteínas desacoplates como la UCP-1 (considerada como un marcador exclusivo de adipocitos marrones). A este fenómeno se denominó termorregulación no tiritante y se consideró como un mecanismo puente hasta desarrollarse completamente el sistema de termorregulación tiritante, controlado por el SNC y caracterizado por generar calor mediante contracciones rítmicas del tejido muscular. De esta forma, a medida que el recién nacido se iba desarrollando, los depósitos de TAP a su vez disminuían, por lo que se suponía que en la etapa adulta este tejido o no estaba presente o que podría encontrarse en cantidades muy pequeñas [72].

Basándose en este principio de función puente del TAP durante el desarrollo y debido a la inexistencia en esos momentos de técnicas sensibles que permitieran comprobar la existencia de TAP activo en humanos adultos, durante años el estudio de este tejido en humanos pasó relativamente inadvertido [97]. Sin embargo en la última década, los avances en las técnicas de detección y los recientes descubrimientos indicando la presencia de este tejido también en adultos, supusieron un vuelco en la percepción general sobre este tejido, dotándole de una gran importancia a nivel endocrino y de regulación de la homeostasis energética.

Gracias a la tomografía por emisión de positrones - tomografía computerizada (PET-CT) la visión del TAP ha dado un vuelco. Esta tecnología, muy utilizada en el diagnóstico de tumores malignos se basa en el uso del análogo de la glucosa, la 18F-fluorodeoxiglucosa (FDG), que se incorpora a células con elevadas tasas metabólicas como las células tumorales. En estudios recientes se encontraron tasas de retención de FDG simétricas y elevadas en regiones en donde no se encontraba presente ningún tumor que se identificaron como tejido adiposo. Además se observó que dicha retención de FDG se incrementaba a bajas temperaturas ambientales, mientras que se reducía al realizar un tratamiento previo con bloqueadores beta-adrenérgicos implicados en la absorción de glucosa en un mecanismo que depende directamente de la activación de UCP-1. Con estas pruebas se llegó a la conclusión de que el marcaje por FDG en el tejido adiposo en regiones específicas estaba reflejando la actividad metabólica del TAP. Tras estos descubrimientos han surgido numerosas cuestiones relacionadas con sus posibles funciones y su importancia fisiológica. Varios estudios han relacionado este tejido con la regulación del gasto energético corporal, estando implicado, al menos en parte, tanto en la termogénesis inducida por calor como en la inducida por la dieta [98].

Estos descubrimientos han revitalizado el interés en el estudio de este tejido con el fin de encontrar métodos más útiles para combatir la obesidad. Así, se ha estimado que la activación de aproximadamente 50 g de TAP es suficiente para incrementar alrededor de un 20% el gasto energético diario en una persona que consume unos 2500 kcal/día, equivalente a los beneficios obtenidos por un individuo tras haberse sometido a dieta o a ejercicio físico para disminuir su peso corporal [99].

4.3.1 Localización

En humanos adultos el TAP se localiza comúnmente en la región supraclavicular-cervical, en la región ventral del cuello y las regiones superficial y lateral a los músculos esternocleidomastoideos. En individuos con altas tasas de retención de FDG, se localizó también la presencia de TAP entre los músculos pectorales y subcapulares, la

región posterior al plexo braquial y en diversas regiones a lo largo de la línea paraespinal (figura 13) [100].

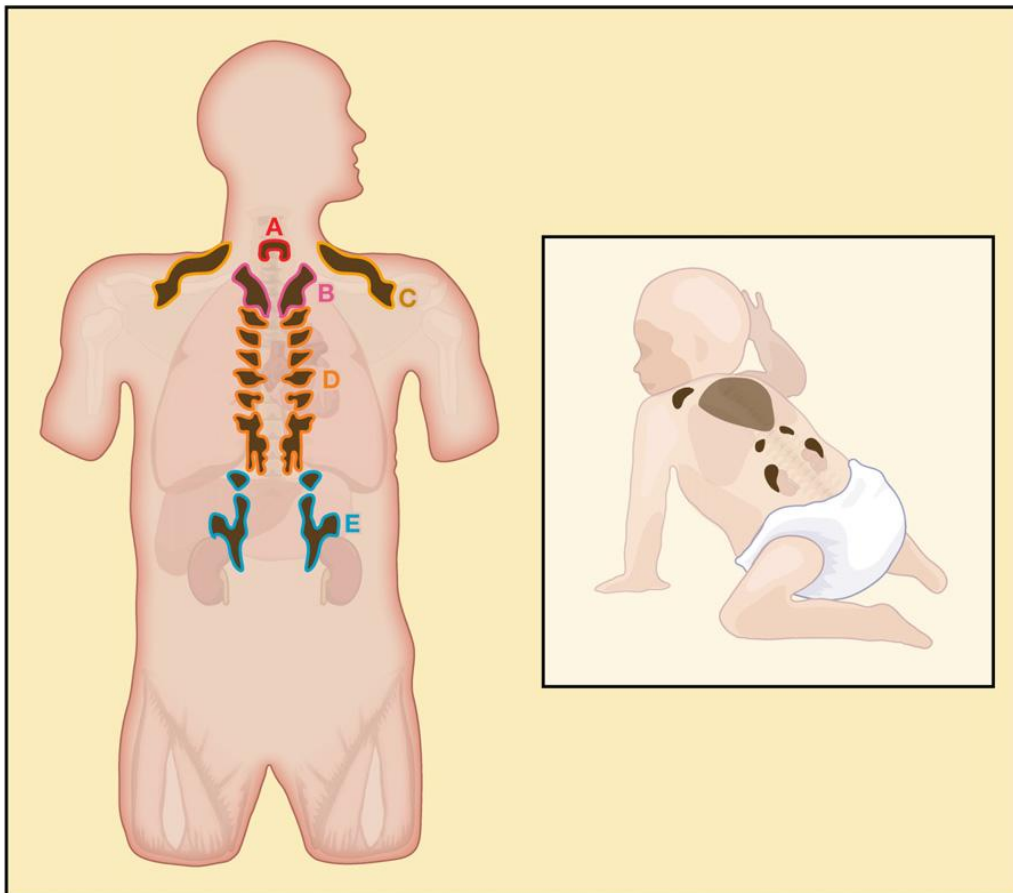


Figura 13: Localización del TAP en adultos y recién nacidos según los datos aportados postmortem y mediante estudios PET/CT. (A) tiroide/traqueal, (B) mediastinal, (C) paracervical/supraclavicular, (D) paratoracal, (E) supra y perirenal. Tomada de [101].

La presencia de TAP en adultos está relacionada directamente con la edad, más del 50% de las personas de entre 20-30 años presentan TAP activo, pero a medida que aumenta la edad, este porcentaje se va reduciendo, detectándose este tejido únicamente en un 10 % de los individuos analizados de 50-60 años. Se ha comprobado que en mujeres se encuentran mayores cantidades de TAP activo que en hombres en rangos que van entre 2 y 3 veces más cantidad. También se ha encontrado una relación inversa entre el IMC y la presencia de TAP activo, lo que refuerza la idea de que este tejido presenta una importante función metabólica en adultos [98, 100].

4.3.2 Tejido adiposo pardo como órgano secretor

Actualmente hay bastante consenso en relación a la capacidad secretora del TAP, sin embargo, debido a las relativas pequeñas cantidades de este tejido presentes en adultos en comparación con el TAB, parece más probable la existencia de una función autocrina/paracrina de las moléculas secretadas por el TAP. Sería necesario realizar estudios sobre la posible implicación endocrina de este tejido para discernir si los péptidos secretados por el TAP conocidos y/o desconocidos se producen en una cantidad suficiente como para llegar a participar en la señalización endocrina del individuo [75].

El TAP secreta una serie de adipoquinas compartidas con el TAB, como la leptina, adiponectina o resistina. La leptina se expresa en TAP sólo en condiciones de inactividad o de atrofia. En condiciones asociadas a la activación de TAP, como el frío, disminuyen los niveles de expresión génica de leptina, llegando incluso a ser indetectables. Su secreción está relacionada con la estimulación de los receptores beta-adrenérgicos de la propia célula. Se piensa que los adipocitos marrones reaccionan al igual que los adipocitos blancos secretando leptina como información de las reservas lipídicas que presenta. La secreción de esta proteína puede ser considerada como una característica de adipocitos marrones poco diferenciados (con respecto a su capacidad termogénica)

La adiponectina también es secretada por el TAP y se comporta de manera similar a la leptina, con los mismos patrones de secreción que los adipocitos blancos en situaciones de poca diferenciación. Por otro lado, se ha descrito la secreción de la hormona resistina en TAP, sin embargo al contrario que en el caso de leptina o adiponectina, su regulación y posible función en este tejido es desconocido actualmente [75]

5. Tejido muscular esquelético

El tejido muscular esquelético es cuantitativamente el tejido más grande del cuerpo, suponiendo el 30-40% del gasto metabólico en reposo de un adulto. Es el mayor sitio de oxidación de ácidos grasos y glucosa; y presenta una gran flexibilidad para utilizar diferentes fuentes de energía en respuesta a condiciones de escasez energética [102].

El músculo esquelético es un tejido heterogéneo. La unidad funcional del sistema motor, o la unidad motora, está compuesta por una neurona motora y un conjunto de fibras musculares con propiedades estructurales y funcionales similares pero no idénticas. El músculo se compone de muchas unidades motoras (de decenas a cientos)

ensambladas juntas, y cada una de ellas contribuyen de manera específica y distinta. El reclutamiento selectivo de las unidades motoras permite al músculo responder de la mejor manera a las demandas funcionales.

La heterogeneidad de las fibras musculares es la base de la flexibilidad que permite a un mismo músculo ser usado para acciones tan distintas como la realización de actividades de intensidad continua y débil como son la postura, contracciones repetitivas durante la locomoción, o incluso a contracciones rápidas y fuertes durante saltos o patadas. De manera adicional, las propiedades funcionales y estructurales de las fibras, pueden cambiar en respuesta a estímulos hormonales o neuronales, siendo la actividad neuronal el mayor determinante del tipo de fibras presentes en el músculo. A esta característica se la denomina plasticidad muscular [103]. Los cambios en la composición de las fibras también son parcialmente responsables de algunas de los problemas y comorbilidades que sufren personas tras una prolongada inactividad física, que pueden derivar incluso en la pérdida de la capacidad motora y una denervación muscular.

5.1 Clasificación de los tipos de fibras musculares

Cada una de las unidades motoras del músculo recibe el nombre de sarcómero, y está compuesto principalmente por las proteínas miofibrilares miosina y actina, la interacción entre estas dos proteínas es lo que permite a los músculos contraerse (figura 14). Las propiedades histológicas, bioquímicas, morfológicas o fisiológicas de estas unidades son la base para la clasificación de los distintos tipos de fibras musculares.

Inicialmente, los músculos se clasificaron como rápidos o lentos, según la velocidad de contracción y basándose en criterios morfológicos, pues los músculos lentos tienen un vivo color rojo en varias especies, mientras que los músculos rápidos son más claros o incluso blanquecinos en aves. El color rojo es el resultado de las altas concentraciones de hemoglobina debido a la mayor cantidad de capilares. Estas propiedades confieren al músculo lento una mayor capacidad oxidativa con respecto a los músculos rápidos.

Otro criterio para la clasificación de las fibras musculares es en función de la acción de la enzima ATPasa de la miosina. En humanos el ratio de hidrólisis de la ATPasa de las fibras rápidas es de dos a tres veces mayor que para las fibras lentas. Mediante tinciones histoquímicas, las fibras musculares se clasificaron como de tipo I (que equivalen a las fibras lentas) y de tipo IIA o IIB (fibras rápidas), aunque recientemente también se han descrito otros tipos de fibras con velocidades de contracciones intermedias entre los tipos I y IIB que se denominaron IC, IIC, IIAC y IIAB. Estos últimos subtipos surgieron por las diferencias observadas por algunos grupos de investigación

en las intensidades de las tinciones. Sin embargo en la mayoría de los estudios que se realizan actualmente, las fibras musculares se engloban dentro de los 3 tipos principales [104, 105]. Mediante la caracterización de las diferentes isoformas de la cadena pesada de la miosina se obtiene un perfil de los tipos de fibras similar al obtenido con la tinción de la actividad ATPasa, ya que estas cadenas contienen los sitios de acción de la ATPasa. Por tanto, las 3 isoformas identificadas originariamente fueron la MHC I, MHC IIa y la MHC IIb; que corresponderían con las formas I, IIA y IIB respectivamente.

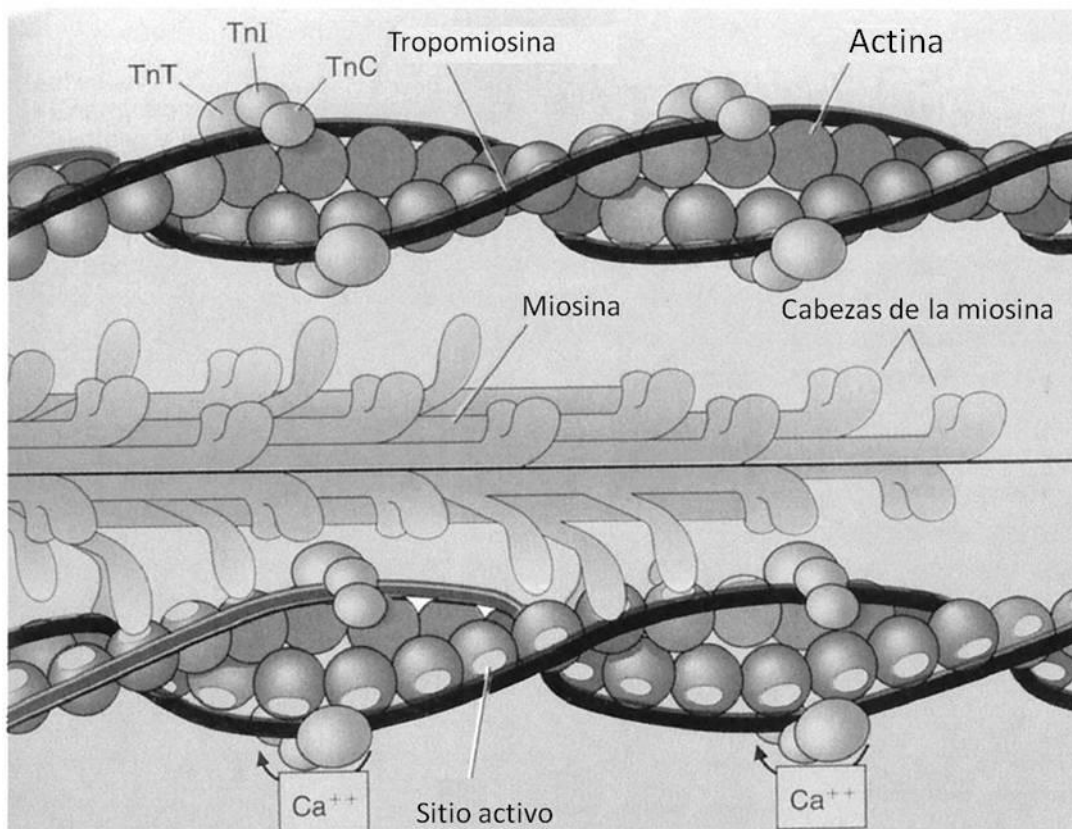


Figura 14: Esquema de la organización de las fibras actina y miosina en el sarcómero. Modificada de [105].

Existe una tercera clasificación de las fibras musculares que combina la información anterior sobre la caracterización de la cadena pesada de la miosina y la acción de la ATPasa, con la información histoquímica de ciertas enzimas que reflejan el metabolismo energético de las fibras. La caracterización de estas enzimas reflejan rutas metabólicas aeróbicas/oxidativas o anaeróbicas/glucolíticas y distingue entre tres tipos de fibras bien diferenciadas: oxidativas lentas (que se puede correlacionar con el tipo I), oxidativas rápidas (tipo IIA) y glucolíticas rápidas (tipo IIB). Sin embargo, mientras que la correlación entre fibras tipo I y oxidativas lentas es bastante buena, en

el caso de las fibras de tipo II no siempre es fiable. De esta forma, las fibras de tipo IIB no siempre presentan un metabolismo principalmente anaeróbico/glucolítico, de la misma forma que no siempre las fibras del tipo IIA presentan un metabolismo aeróbico/oxidativo (tabla 5) [105].

Características	Oxidativas lentas	Oxidativas rápidas	Glucolíticas rápidas
<u>Características contráctiles</u>			
Velocidad de máxima tensión	1.0	0.4	0.4
Ca ²⁺ -ATPasa de la miosina	1.0	3.0	3.0
Mg ²⁺ -ATPasa de la actomiosina	1.0	2.8	2.8
<u>Actividad enzimática</u>			
Creatina fosfoquinasa	1.0	1.3	1.3
Fosfofructoquinasa	1.0	1.5	2.1
Glucógeno fosforilasa	1.0	2.1	3.1
Citrato sintasa	1.0	0.8	0.6
<u>Características morfológicas</u>			
Densidad capilar	1.0	0.8	0.6
Densidad mitocondrial	1.0	0.7	0.4
<u>Propiedades metabólicas</u>			
Potencial oxidativo	1.0	0.7	0.2
Potencial glucolítico	1.0	1.5	2.0
Fosfocreatina	1.0	1.2	1.2
Glucógeno	1.0	1.3	1.5
Triacilglicerol	1.0	0.4	0.2

Tabla 5: Algunas características de los principales tipos de fibras descritos. Modificada de [106].

5.2 Variabilidad

En humanos existe un marcado dimorfismo sexual, en donde el ratio de fibras tipo II / tipo I es mayor en hombres, posiblemente debido a la mayor hipertrofia de las fibras del tipo II inducida por la testosterona. También se encuentran diferencias sexuales con respecto a algunas rutas metabólicas, en especial del metabolismo lipídico; los niveles proteicos del triacilglicerol intramuscular y de la translocasa de ácidos grasos son mayores en mujeres que en hombres, utilizando más lípidos como fuente de energía que los hombres durante el ejercicio. Los factores responsables de estas diferencias en el metabolismo del músculo todavía no se conocen.

También existe una variabilidad individual en la composición del tipo de fibras del tejido muscular esquelético. En estudios realizados en el músculo vastus lateralis de varios individuos, se encontró que el porcentaje de fibras del tipo I presentes iba desde el 15% en algunos individuos, mientras que en otros alcanzaba porcentajes de hasta el 85%. Los análisis de biopsias de músculos procedentes de gemelos monocigóticos y heterocigóticos concluyeron que casi el 50% de esta variabilidad está regida por factores genéticos. Biopsias realizadas en músculos de atletas también mostraron estas variaciones en el tipo de fibras, con una marcada tendencia por la predominancia de fibras tipo II en atletas que realizan ejercicios de explosión o de sprint, y del tipo I en atletas que realizan ejercicios de esfuerzo o resistencia [103].

Durante el envejecimiento se produce una progresiva pérdida de masa muscular y una disminución de la eficacia en la captación de oxígeno por parte de este tejido, lo que conduce a una reducción en el rendimiento muscular llegando incluso a la pérdida de su funcionalidad. La pérdida de masa muscular observada en esta etapa es debida en primer lugar por la reducción del número total de ambos tipos de fibras, y en segundo lugar por la atrofia que ocurre preferentemente en las fibras de tipo II; este hecho conduce a que exista una mayor presencia de fibras lentas en ancianos, y está evidenciado por la lenta velocidad de contracción y relajación en los músculos viejos [105].

5.3 Plasticidad muscular

El músculo esquelético presenta una capacidad intrínseca para detectar estímulos mecánicos y convertir esta información en señales bioquímicas que regulan el crecimiento. Los cambios en la masa y función muscular también tienen lugar en respuesta a la edad, cambios nutricionales, respuestas fisiológicas positivas (ejercicio) o negativas (inactividad) o incluso en respuesta a diversas enfermedades [105]. La plasticidad muscular que puede conducir a la atrofia o a la hipertrofia del músculo está regulada por diferencias en el balance entre la síntesis y la degradación proteica. La hipertrofia tiene lugar durante procesos normales de crecimiento, pero también por ejemplo tras un programa de entrenamiento de resistencia, y ocurre como consecuencia de un incremento de la síntesis proteica. Sin embargo, durante este programa de entrenamiento, se incrementa la degradación proteica y la oxidación de aminoácidos para obtener energía, a la vez que se inhibe la síntesis proteica [107]. El músculo también tiene una gran capacidad para incrementar su rendimiento mediante cambios tanto cuantitativos como cualitativos en el uso de reservas de energía y en su catabolismo, sobre todo con respecto a los cambios que favorecen las rutas metabólicas aeróbicas/oxidativas [108].

La plasticidad muscular también implica una conversión de las fibras de un tipo a otro dependiendo de las diferentes demandas funcionales. Los cambios entre las fibras

IIB y IIA son los más comunes, pero también se pueden producir conversiones del tipo I al tipo II, o viceversa (aunque en este sentido existe controversia). La falta de uso del músculo esquelético por inactividad física puede derivar en la transformación de las fibras lentas hacia los tipos más rápidos, también se observa una reducción de las enzimas asociadas con el metabolismo aeróbico/oxidativo.

El ejercicio físico es un factor fundamental que dirige la plasticidad muscular, los entrenamientos que demandan una alta tasa metabólica (ejercicio de resistencia) conducen al incremento de la capacidad oxidativa de todos los tipos de fibras musculares, a través del aumento del número de mitocondrias, enzimas aeróbicas/oxidativas y una mayor capilarización del músculo. También se produce un cambio en la composición de la cadena pesada de miosina, de forma que progresivamente se va disminuyendo el porcentaje de fibras del tipo IIB a favor de los tipos más lentos, en especial las del tipo IIA. Actualmente existen pocas evidencias de que los ejercicios de resistencia puedan transformar las fibras del tipo II en tipo I, sin embargo sí que se ha observado que durante estos ejercicios las fibras del tipo I se vuelven más rápidas sin constatar cambios en el tipo. Por tanto, las adaptaciones al ejercicio de resistencia dependen del tipo de fibra, las de tipo I se vuelven más rápidas, mientras que las del tipo II más lentas, mientras que ambos tipos incrementan su capacidad aeróbica/oxidativa [105].

5.4 El músculo como órgano endocrino

Desde hace bastantes años se sabe que las rutas de señalización que comunican al músculo esquelético con otros órganos no están solamente mediadas por el sistema nervioso, ya que la estimulación eléctrica de músculos paralizados, sin impulsos nerviosos aferentes o eferentes, en pacientes con lesión medular, induce una serie de cambios fisiológicos similares a los observados en individuos sanos. Basándose en estos indicios, muchos investigadores tienen claro que debe existir algún tipo de factor humoral que esté implicado en esta señalización independiente del sistema nervioso [109, 110].

El efecto protector del ejercicio frente a enfermedades relacionadas con la inflamación crónica es bien conocido, y este efecto podría estar relacionado por el efecto anti-inflamatorio que puede estar ejerciendo el músculo durante el ejercicio regular. Al igual que ocurrió con el tejido adiposo tras el descubrimiento de la leptina, se ha postulado que el tejido muscular esquelético podría comportarse también como un órgano endocrino con la capacidad de producir, expresar y liberar a la circulación una serie de citoquinas u otros péptidos que ejercerían un efecto paracrino y/o endocrino. Estos factores recibieron el nombre de mioquinas y dado que el músculo esquelético es el tejido más grande del cuerpo humano, el demostrar la existencia de estas mioquinas supondría el establecimiento de un nuevo paradigma que situaría al

músculo como pilar central en el desarrollo evolutivo del metabolismo del resto de órganos del cuerpo humano y a las mioquinas como factores importantes o incluso clave en la regulación del metabolismo general. Este paradigma ofrecería las bases que podrían explicar las múltiples consecuencias que conlleva llevar un estilo de vida sedentario (figura 15) [31].

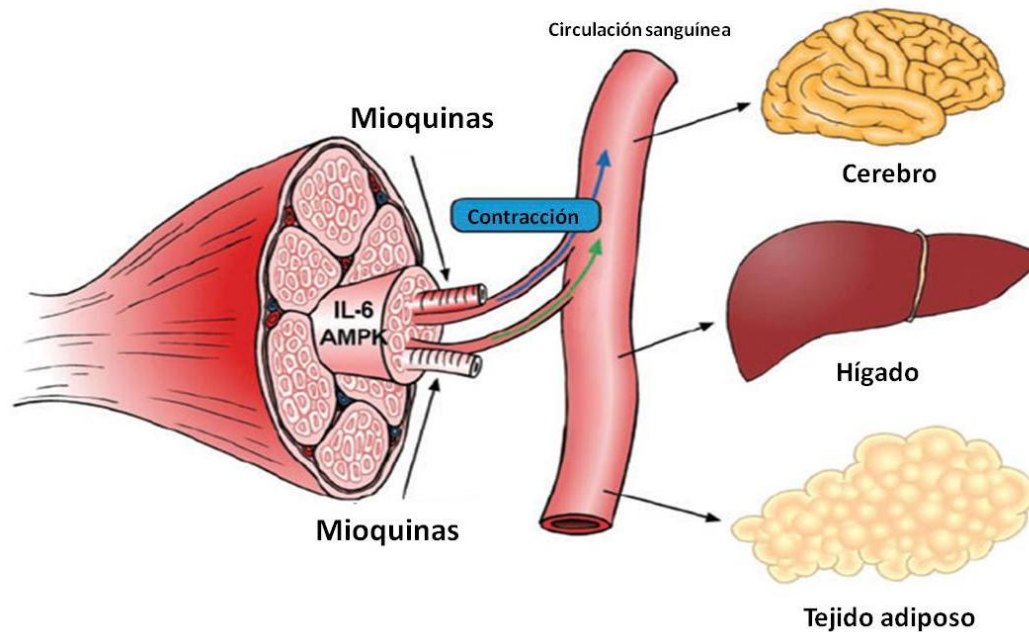


Figura 15: El tejido muscular esquelético libera al torrente circulatorio mioquinas con acción tanto a nivel central como periférico. Modificada de [31].

5.4.1 Interleuquina-6: la primera mioquina descrita.

La IL-6 tiene el honor de ser la primera mioquina descrita y la más estudiada. Fue caracterizada como mioquina al descubrirse que sus niveles circulantes se encontraban incrementados hasta más de 100 veces durante el ejercicio. Esta proteína ya era conocida desde hacía años como citoquina procedente de diferentes células inmunitarias; sin embargo al demostrarse que era producida y secretada por el tejido muscular esquelético durante el ejercicio, se produjo un renovado interés por su estudio. La existencia de esta mioquina suponía una paradoja, ya que por un lado los niveles circulantes de IL-6 se encontraban significativamente más elevados en los periodos inmediatamente posteriores al ejercicio, periodos en los que se observa una mayor sensibilidad a la insulina y cuando su acción es más eficaz. Sin embargo, por otro lado la presencia de esta proteína había sido también asociada a la obesidad y a la resistencia a insulina [111].

Numerosos estudios han demostrado que la IL-6 se secreta en respuesta a contracciones musculares y ejerce una serie de efectos en varios órganos periféricos, que van desde el incremento de la absorción de glucosa a la inducción de la oxidación de ácidos grasos [112, 113]. También se ha demostrado que la IL-6 produce un incremento en la producción de glucosa hepática durante el ejercicio, así como favorecer la lipólisis en el tejido adiposo [111].

Pero la IL-6 no es la única mioquina descubierta, se han descrito diversas proteínas secretadas por el tejido muscular esquelético con un posible efecto endocrino como la IL-8, IL-15, el factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF-21), la proteína relacionada con la folistatina 1 o la mioquina de reciente descubrimiento mionectina [114, 115].

5.4.2 El papel de la proteína PGC-1 α en la expresión de los “genes del ejercicio”

El coactivador-1 α del receptor activado de proliferación de los peroxisomas γ (PGC-1 α), que fue originariamente identificado como un factor que interactuaba con la proteína PPAR- γ en tejido adiposo pardo, es un coactivador de la transcripción que no se une al ADN pero que presenta una fuerte acción estimuladora de la expresión de determinados genes al unirse a diversos factores. PGC-1 α induce la biogénesis mitocondrial y la expresión de enzimas oxidativas en diferentes tipos celulares [32].

La proteína PGC-1 α se expresa en el tejido muscular esquelético de una forma diferencial, siendo mayores los niveles observados en músculos lentos que en los rápidos. El ejercicio puede inducir una rápida activación de PGC-1 α , que al translocarse al núcleo induce el incremento en la transcripción de enzimas mitocondriales, acción que se lleva a cabo antes incluso de observarse un incremento en los niveles de expresión del ARN mensajero (ARNm) de PGC-1 α [116]. El papel del ejercicio sobre esta proteína parece estar al menos en parte mediado por el sistema nervioso simpático y por la activación de los receptores β 2 adrenérgicos, ya que la sobreexpresión de PGC-1 α inducida por el ejercicio puede ser evitada mediante el uso de inhibidores específicos para este receptor [117].

Los estudios realizados en ratones transgénicos que sobreexpresan PGC-1 α mostraron un aumento en el contenido de mitocondrias en las fibras musculares rápidas, así como un incremento de los niveles de las enzimas oxidativas. Se observó también que aumentaba la proporción de fibras tipo I y IIA haciendo a los músculos más resistentes a la fatiga [103]. Estudios realizados en músculo esquelético de individuos obesos demostraron que estos poseían una menor cantidad de mitocondrias que en individuos normopeso, dado que PGC-1 α es un potente inductor de la biogénesis mitocondrial, se descubrió que la elevación de ácidos grasos libres plasmáticos reducían la expresión de PGC-1 α en músculo, y que la reducción en la

expresión de esta proteína se asociaba a obesidad y diabetes tipo 2; esto se relacionaba directamente con las deficiencias de ejercicio físico, ya que estos pacientes normalmente llevan una vida sedentaria [118].

En 2008 el grupo de Spiegelman propuso la hipótesis de que la proteína PGC-1 α era el factor clave que relacionaba el ejercicio con los beneficiosos efectos sistémicos que produce sugiriéndose como el mayor responsable de la protección frente a las diferentes enfermedades relacionadas con el sedentarismo. Este grupo postuló que la reducción en la expresión de PGC-1 α en músculo esquelético debida a estilos de vida sedentarios, podría estar causando una respuesta proinflamatoria crónica que afectaría negativamente a otros tejidos. Por tanto, al eliminar este estado de inflamación crónica mediante la inducción de PGC-1 α con el ejercicio, disminuiría la frecuencia o la severidad de las enfermedades inflamatorias relacionadas, muchas de ellas asociadas con la obesidad. La cascada de efectos beneficiosos producidos por la PGC-1 α y que derivan en una supresión de la inflamación crónica, van desde inducir una mayor vascularización del músculo, incrementar su capacidad de detoxificación de las especies reactivas del oxígeno (ROS), mejorar las capacidades metabólicas de este tejido mediante la biogénesis mitocondrial y sobre todo la inducción de la expresión de toda una serie de genes implicados en los efectos beneficiosos del ejercicio (los cuales denominaron “genes del ejercicio”), desde enzimas oxidativas a posibles factores secretados por el músculo (figura 16) [32].

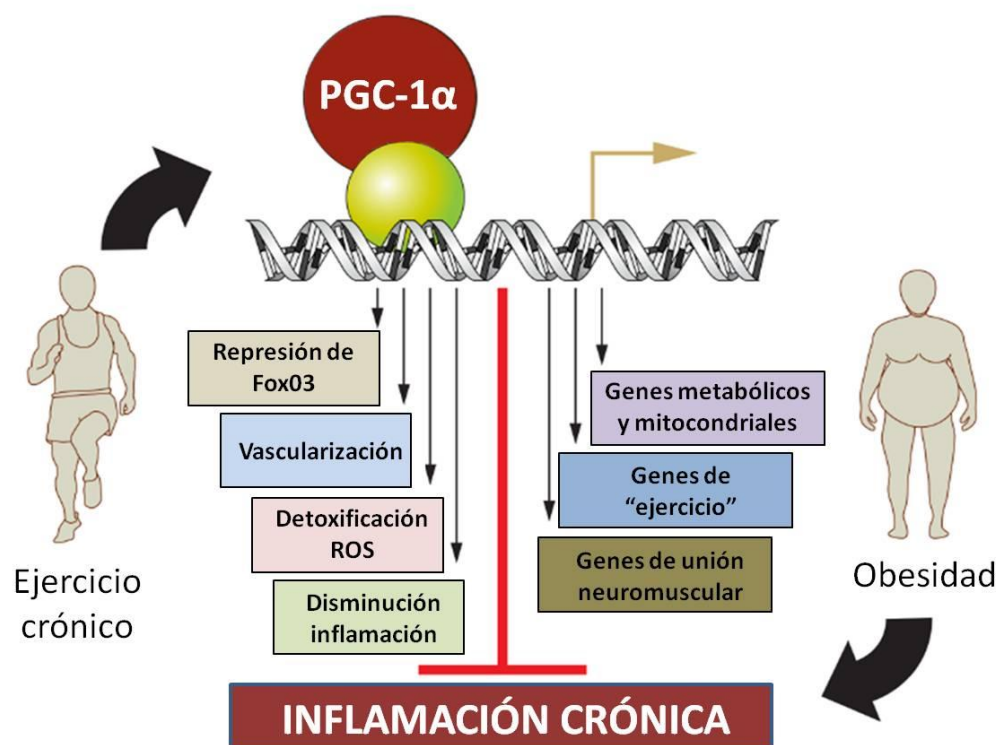


Figura 16: Efectos derivados de la acción de la PGC-1 α . Modificada de [32].

5.4.3 La FNDC5/irisina como mioquina inducida por PGC-1 α

La sospecha de que la proteína PGC-1 α podría estar implicada en la secreción por parte del músculo de proteínas con una función endocrina condujo al grupo de Spiegelman a realizar una serie de estudios para intentar demostrar este hecho. Estudiaron ratones transgénicos que sobreexpresaban PGC-1 α en músculo, observando que estos animales eran resistentes a la obesidad relacionada con la edad y a diabetes, lo que sugería que presentaban algún tipo de alteración del balance energético sistémico [119]. Este grupo se centró en el estudio de los genes encargados de activar el programa termogénico y el desarrollo del tejido adiposo pardo, descubriendo que en el TAS de estos ratones transgénicos aparecían una serie de adipocitos con características similares a los adipocitos marrones, con una gran expresión de ARNm de UCP-1, propio del TAP. También observaron una mayor cantidad de células multiloculares en este tejido que presentaban grandes concentraciones de la proteína UCP-1. Por el contrario, tanto en el TAVg como en el TAP no se observaban diferencias. Este modelo y sus efectos (llamado fenómeno de *browning*) también fue observado al someter a ratones de la cepa salvaje a distintos tipos de ejercicio durante 3 semanas [77].

Para evaluar si el fenómeno de *browning* era producido efectivamente por un factor secretado procedente del músculo esquelético, el grupo de Spiegelman realizó un experimento en el que añadía a un cultivo primario de adipocitos del TAS medio de cultivo libre de suero procedente de miocitos que expresaban PGC-1 α , observando en estos adipocitos el incremento de ARNm de varias proteínas específicas del TAP. Mediante el uso de chips de expresión génica pudieron aislar una serie de proteínas reguladas por la acción de la PGC-1 α y con la capacidad en teoría de ser secretadas por el músculo esquelético (IL-15, FNDC5, VEGF- β , LRG1 y TIMP4). Se probó la acción de estas proteínas sobre cultivos primarios de adipocitos de TAS, descubriendo que el factor implicado en el fenómeno de *browning* era la FNDC5.

La fibronectina tipo III con 5 dominios (FNDC5) se caracterizó como una proteína de membrana tipo I de 20 kDa que presenta péptido señal y que sufre una modificación proteolítica del extremo N-terminal que origina un péptido de unos 12 kDa que se secretaría a la circulación siendo susceptible de ser modificado por glucosilación y que correspondería a la forma activa de esta proteína. A este fragmento secretado se le puso el nombre de irisina en relación con la diosa Iris de la mitología griega (la mensajera de los dioses en la Ilíada) y se consideró como una mioquina capaz de iniciar la maquinaria termogénica en el tejido adiposo blanco (figura 17). Sin embargo, los datos aportados mediante técnicas de inmunodetección mostraron una serie de discrepancias con respecto al peso de la irisina y de su modificación proteolítica, puesto que los tamaños de las bandas identificadas como pertenecientes a la irisina en

ningún momento fueron inferiores a 20 kDa, y utilizando anticuerpos específicos frente a la región endógena de la FNDC5 se detectaron grandes cantidades de la proteína completa en el medio de cultivo libre de células [77]. Estos datos sugieren que la proteína FNDC5 puede ser secretada también en su forma completa y que todavía hace falta más conocimiento sobre los mecanismos exactos mediante los cuales esta proteína es secretada por parte de las células musculares.

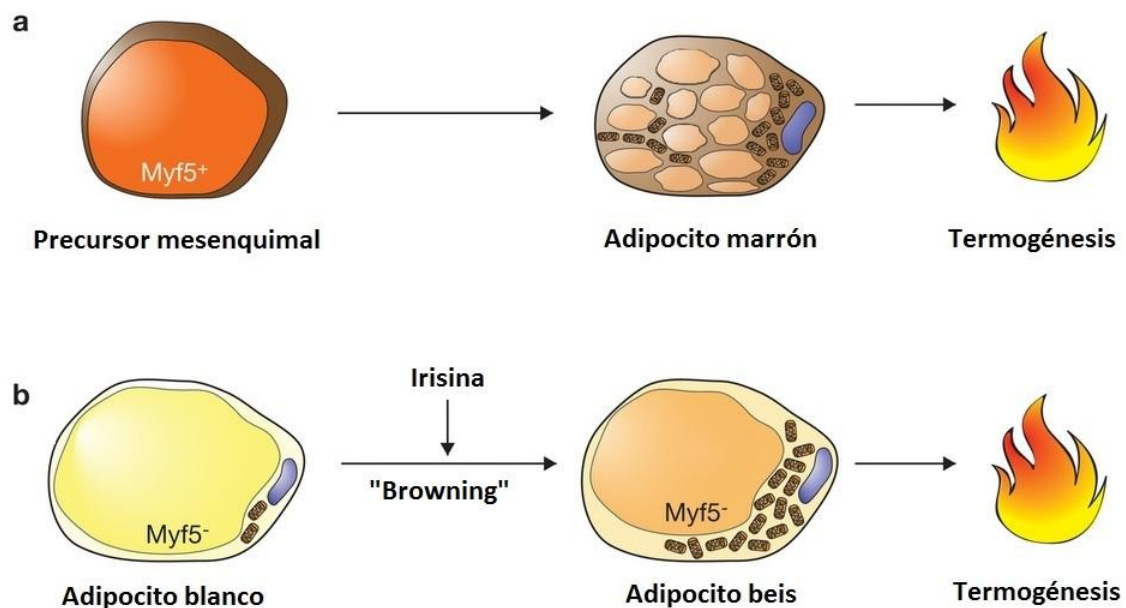


Figura 17: Diferentes modelos de termogénesis mediada por adipocitos. (a) Termogénesis clásica de los adipocitos marrones, (b) termogénesis mediada por los adipocitos beis inducidos por la acción de la irisina. Modificado de [120].

Para ensayar los efectos de esta proteína *in vivo*, el grupo de Spiegelman forzó la sobreexpresión de la proteína completa FNDC5 en el hígado de ratones sometidos a una dieta alta en grasa de la cepa C57BL/6, por ser una cepa susceptible a la obesidad y la diabetes inducida por la dieta. Con los datos aportados con este experimento, se concluyó que el incremento de FNDC5 en la circulación podría aumentar el gasto energético, reducir el peso corporal y mejorar la resistencia a insulina inducida por la dieta.

Como aseveración final, el grupo de Spiegelman destacó el futuro potencial de esta proteína para poder ser usada en la clínica en situaciones de obesidad o resistencia a insulina mediante la inyección directa del péptido y así inducir la termogénesis en el TAS humano y mejorar las condiciones metabólicas del individuo (Figura 18).

Desde la publicación de este trabajo, han surgido numerosos comentarios en las revistas científicas más relevantes, en las que se destaca esta investigación, pero también se demanda un mayor conocimiento e investigación futura sobre la irisina, su papel en el fenómeno de *browning* y sus efectos fisiológicos [121-124]. Por el momento hay pocos trabajos originales sobre esta proteína, y los existentes no ayudan a aclarar el papel de la irisina con respecto a la regulación metabólica del organismo. Incluso en aspectos tan concretos como los niveles de irisina humana en obesidad (niveles que el grupo de Spiegelman no consideraron) se ofrecen datos contrarios, mientras unos grupos encuentran mayores niveles en pacientes obesos [125, 126], otros autores sugieren lo contrario [127].

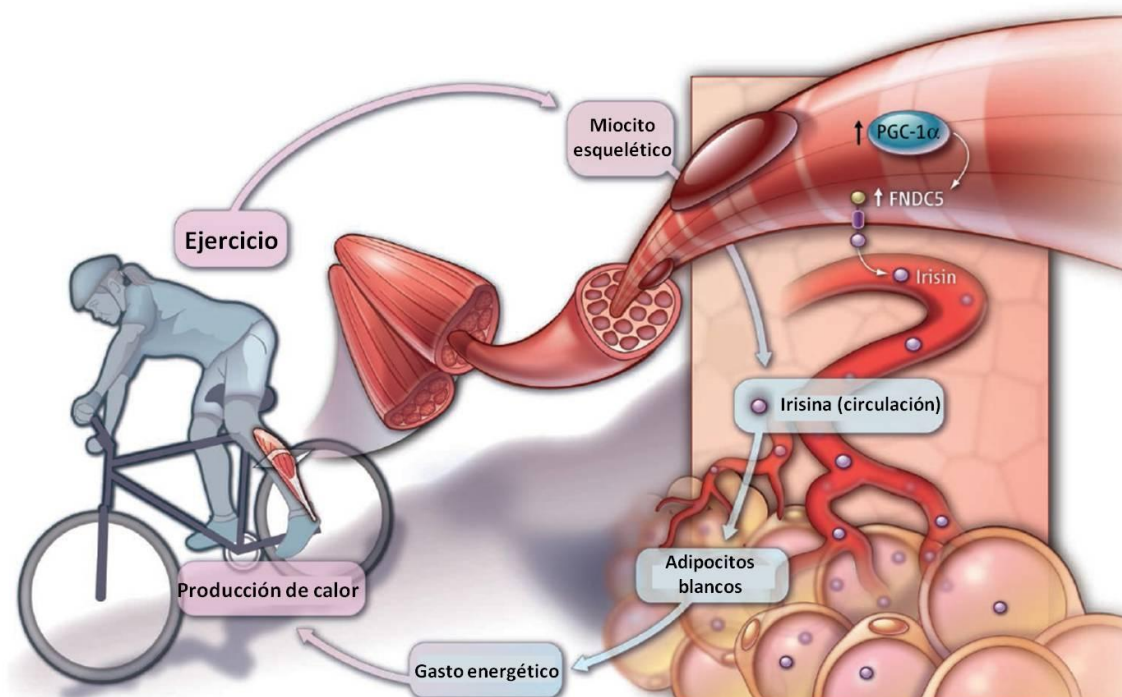


Figura 18: Dibujo esquemático del modelo propuesto para la acción de la irisina. Modificada de [124].

6. Comunicación músculo-adiposo

Durante los últimos 20 años, el conocimiento sobre la comunicación endocrina del organismo ha dado un vuelco completo con la inclusión de dos nuevos órganos dentro del complejo mapa endocrino existente, este hecho supone el establecimiento de un nuevo paradigma en la regulación de la homeostasis energética al otorgar un enorme protagonismo a tejidos que antes se creían inertes endocrinológicamente hablando. El primero de ellos en ser reconocido como tal fue el tejido adiposo con la caracterización de la leptina [66], este hito supuso la puerta de entrada al descubrimiento de decenas

(si no cientos) de adipoquinas implicadas en los grandes aspectos de la regulación metabólica del organismo, desde el mantenimiento del peso corporal hasta el gasto y el rendimiento energético. Este descubrimiento ha derivado en el entendimiento en cierta medida del cómo y del porqué de muchas enfermedades metabólicas, incluyendo la obesidad y la diabetes tipo 2, y supondrá en el futuro un órgano clave para la nueva generación de estrategias terapéuticas para combatir las [128].

Años más tarde, el mismo proceso vivido por el tejido adiposo ha ocurrido de una manera similar con el tejido muscular esquelético. A partir de 2004 se descubrió que este tejido era capaz de producir y secretar de manera activa toda una serie de proteínas (mioquinas) con efectos sistémicos en diferentes tejidos, siendo la primera representante de este nuevo grupo de hormonas la IL-6 [129]; estos hallazgos han llamado la atención de una buena parte de la comunidad científica poniendo de relieve que el tejido muscular esquelético podría estar jugando un papel importante en la comunicación entre los diferentes tejidos implicados en el metabolismo, pudiendo estar implicado en muchas enfermedades relacionadas con procesos de inflamación sistémicos e incluso postularse como una futura diana el tratamiento de estas enfermedades [31].

A raíz de todo este conocimiento generado en los últimos años con respecto a estos dos tejidos y su más que demostrada paralela implicación en el desarrollo de diversas enfermedades endocrinas, ha surgido la hipótesis de la existencia de una comunicación bidireccional entre el tejido muscular y el tejido adiposo por medio de las mioquinas y las adipoquinas respectivamente para el control de diversos procesos metabólicos, en especial en el control de la lipólisis y en la modulación de la sensibilidad a la insulina [130].

Las evidencias de esta comunicación quedan patentes de forma indirecta al observar la relación existente entre la práctica de ejercicio físico con la prevención de la resistencia a insulina en humanos. Pero también existen numerosos ejemplos directos que sugieren esta interrelación. La miostatina es una mioquina que regula negativamente el crecimiento muscular, los animales mutantes para el gen de esta proteína presentan hipertrofia e hiperplasia del tejido muscular esquelético, pero además también se observa una total supresión de la acumulación de grasa corporal lo que sugiere una conexión muy importante entre ambos tejidos. De manera similar, la sobreexpresión en ratones del gen *c-ski*, que regula negativamente la expresión del factor de crecimiento transformante β (TGF- β) producido y secretado en grandes cantidades por el tejido adiposo en condiciones de obesidad, genera un fenotipo de hipertrofia muscular y una marcada reducción en la capacidad de almacenamiento de ácidos grasos por parte de los adipocitos [131]. Otro ejemplo concreto lo protagoniza la interleukina-15 (IL-15), que es una mioquina con efectos anabólicos en el tejido muscular esquelético pero que también parece jugar un papel importante en el

metabolismo lipídico. La IL-15 se sobreexpresa con el ejercicio físico y se ha encontrado una asociación negativa entre los niveles plasmáticos de esta proteína y la presencia de TAV, pero no de TAS en humanos. Confirmando estos datos, en ratones mutantes con sobreexpresión de IL-15 y por tanto niveles elevados de esta proteína en plasma, se observó una significativa reducción en el peso corporal y un incremento el contenido mineral óseo, sin afectar a la cantidad total de masa muscular corporal o a los niveles de otras citoquinas conocidas; lo que sugiere que la proteína IL-15 podría estar implicada también en la regulación del TAV (figura 19) [111].

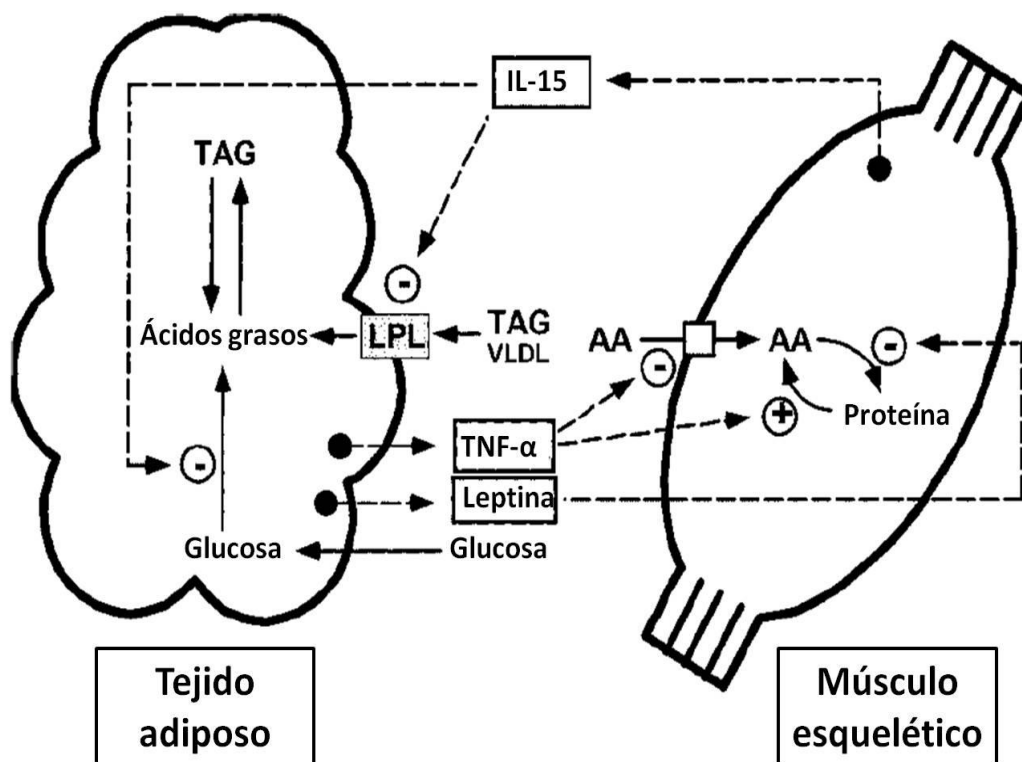


Figura 19: Esquema de la hipotética comunicación cruzada entre el tejido muscular esquelético y el tejido adiposo a través de la IL-15 y las hormonas TNF- α y leptina respectivamente. Modificado de [131].

Pero el mayor ejemplo que evidencia la comunicación bidireccional entre el músculo y el tejido adiposo es la IL-6, proteína que actúa como una mioquina secretada a la circulación por el músculo con efectos directos sobre el tejido adiposo, pero que también actúa como una adipoquina secretada por el mismo tejido adiposo afectando al músculo [132]. La IL-6 es la mioquina más estudiada y conocida, se sabe que se secreta a la circulación en grandes cantidades durante el ejercicio y que la estimulación a corto plazo de miocitos con esta proteína mejora la sensibilidad de los mismos a la insulina; sin embargo el incremento crónico de esta proteína se relacionan con la resistencia a la insulina en humanos. La IL-6 también se encarga de activar la

lipólisis en el tejido adiposo, y parece jugar un papel muy importante en la disponibilidad de energía durante el ejercicio. Que esta proteína parezca tener funciones contradictorias y que sus niveles aparezcan muy elevados tanto en ejercicio como en obesidad sugiere que los efectos de la IL-6 son dependientes del tejido que la produce y de la condición metabólica en la que se encuentra el individuo. Estudios recientes de los efectos agudos de la administración de IL-6 en el tejido adiposo y muscular de individuos sanos demostraron que mientras el tejido adiposo se mantenía inalterado, en el músculo se activaba la ruta de señalización de STAT3 (implicada en la proliferación celular) y se incrementaba la lipólisis; lo que apoya la hipótesis de que la mioquina IL-6 presenta una gran importancia en el rendimiento muscular durante la contracción aguda, mientras que la IL-6 como adipoquina, especialmente cuando se encuentra elevada crónicamente, puede inducir la resistencia a la insulina del músculo [130].

Hasta la fecha se han caracterizado numerosas hormonas procedentes del tejido adiposo y muscular (tabla 6), y a medida que avancen las investigaciones con respecto a la capacidad secretora de ambos tejidos y su papel en la señalización celular, la relación entre ambos tejidos se irá aclarando aún más [131].

Producción	Tejido adiposo	Músculo esquelético
TNF- α	+	+
IL-6	+	+
IL-15	-	+
Leptina	+	+
ASP	+	-
Acrp30	+	-
PAI-1	+	+

Tabla 6: Algunas de las proteínas secretadas que podrían jugar un papel muy importante en la comunicación bidireccional entre el tejido adiposo y el tejido muscular esquelético. Modificada de [131].

7. Secreción proteica

7.1 Tipos de Secreción

Las proteínas secretadas son una clase importante de proteínas cuya codificación supone aproximadamente el 10 % del genoma humano [133]. La mayor parte son proteínas del suero (por ejemplo albúmina, transferrina o inmunoglobulinas), proteínas de la matriz extracelular (por ejemplo colágenos, proteoglicanos, fibronectina o lamininas), enzimas digestivas (por ejemplo la tripsina), o proteínas de la leche. Otras proteínas, a pesar de encontrarse en comparación en muy bajas concentraciones, son altamente bioactivas, dentro de este grupo se incluirían los factores de crecimiento, citoquinas, hormonas o proteasas procesadoras de la matriz extracelular [134].

El término secretoma engloba todas las proteínas liberadas por una célula, tejido u organismo al medio extracelular, a través de mecanismos de secreción tanto clásicos como no clásicos. En el mecanismo clásico, una vez sintetizadas, las proteínas se translocan al lumen del retículo endoplasmático (RE), son transportadas a través del aparato de Golgi y liberadas por exocitosis [135]. Estas proteínas se expresan a partir de un ARNm que presenta una secuencia señal que guía el paso del ribosoma a la membrana del RE e inicia el transporte del péptido hacia el lumen del RE. Esta secuencia señal del RE, que normalmente se encuentra en la región amino-terminal del péptido, se compone de uno o más aminoácidos cargados positivamente seguidos de una cadena continua de 6 a 12 residuos hidrofóbicos. Esta secuencia señal normalmente se corta en los ribosomas y no se encuentra en el péptido final (figura 20).

Por otro lado, en las vías no clásicas de secreción, no se produce el paso de los péptidos a través del RE y el aparato de Golgi, pero hasta el momento el mecanismo exacto por el que se regula este proceso todavía es desconocido [136]. Se han descrito numerosas proteínas que no se secretan por la vía clásica, como ciertos reguladores de la respuesta inmune. Otros ejemplos son factores de crecimiento, diferenciación o angiogénesis que no presentan péptido señal, como por ejemplo el factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF), lectinas como la galectina 1 y 3, y ciertos miembros de la familia de las interleuquinas como la IL-1b. Se han descrito al menos 5 rutas de secreción no clásica (figura 21):

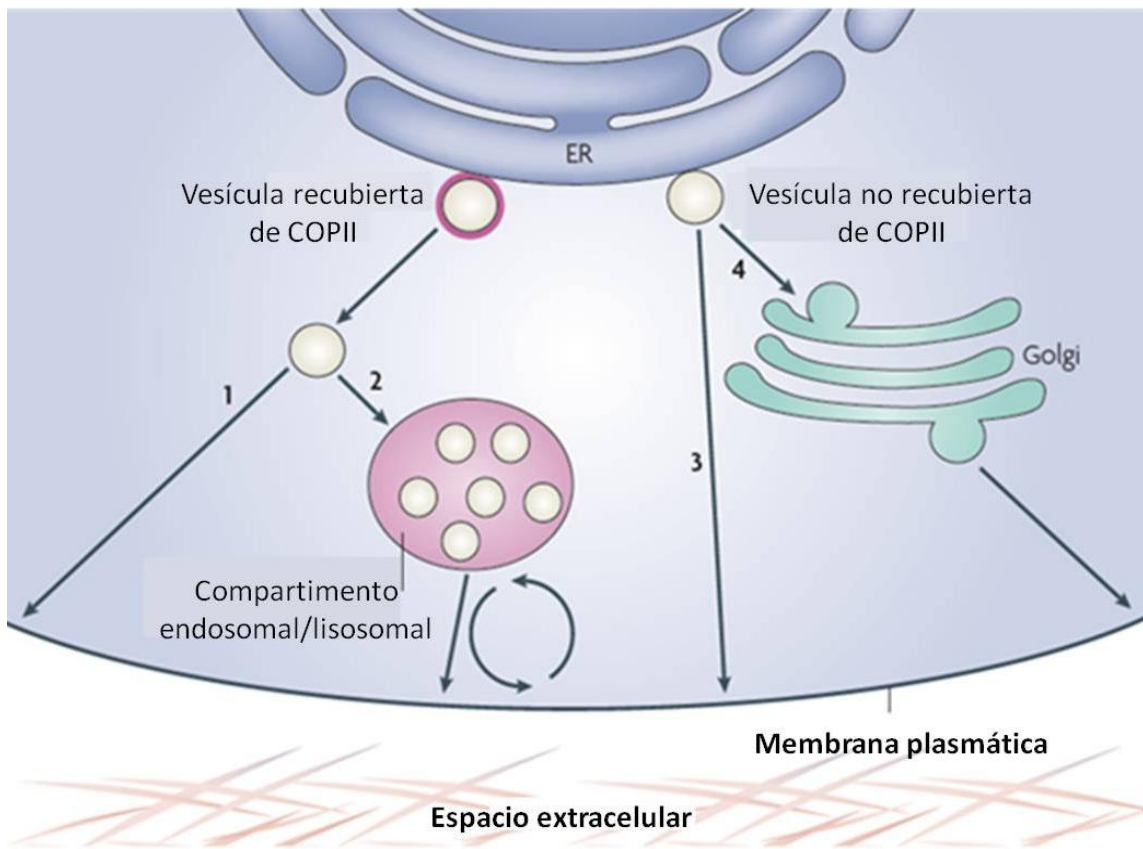


Figura 20: Rutas esquemáticas de secreción clásica a través del retículo endoplasmático. Mecanismo 1: tras pasar por el RE las proteínas que contienen péptido señal se traslocan a vesículas recubiertas de clatrina que se fusionan directamente con la membrana plasmática. Mecanismo 2: de forma alternativa, estas vesículas pueden fusionarse con compartimentos endosomales o lisosomales. Las proteínas también pueden traslocarse a vesículas no recubiertas con clatrina liberando su contenido directamente al espacio extracelular (mecanismo 3) o tras atravesar el aparato de Golgi (mecanismo 4). Modificado de [136].

1. Traslocación directa a través de la membrana plasmática (por ejemplo FGF 1 y 2)
2. A través de la secreción de vesículas lisosomales al medio extracelular (por ejemplo IL-1 β).
3. Secreción a través de la liberación de vesículas intracelulares que probablemente provienen de subcompartimentos endosómicos (también documentado como tipo de secreción de IL-1 β)
4. A través de exosomas que liberan su contenido al espacio extracelular (por ejemplo las galectinas).
5. Traslocación mediada por transportadores a través de un sistema de membrana tipo flip-flop (por ejemplo la proteína de la superficie celular de *Leishmania* HASPB).

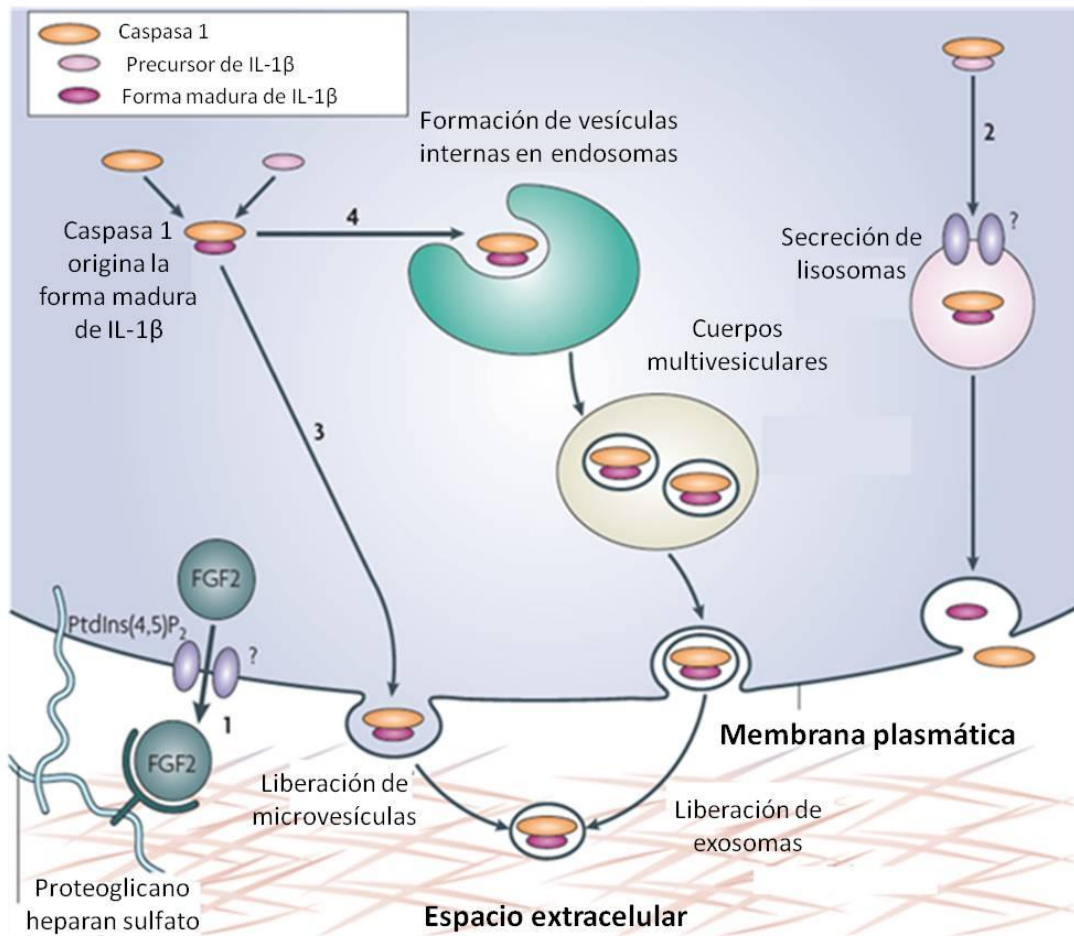


Figura 21: Ejemplos de mecanismos de secreción no convencionales. Modificado de [136].

Precisamente, las rutas de secreción no clásicas han sido estudiadas en los adipocitos diferenciados procedentes de la línea celular de ratón 3T3-L1, mediante el aislamiento de microvesículas secretadas [137]. Este estudio, realizado mediante el uso de técnicas de cromatografía líquida de alta presión combinadas con la espectrometría de masas en tándem (HPLC-MS/MS), permitió la identificación de numerosas proteínas en la región extracelular, que anteriormente se habían catalogado como proteínas integrales de membrana, citosólicas o nucleares; como la caveolina-1, la quinasa c-Src y la proteína de shock térmico 70.

7.2 Softwares de predicción

Uno de los principales problemas en los estudios de la secreción proteica de células, tejidos u órganos es que puede producirse la liberación de proteínas intracelulares debido a roturas celulares producidas por la manipulación de las muestras o por apoptosis celular. Por lo que es necesario contar con técnicas capaces de discernir

entre las proteínas que realmente se están secretando de las procedentes de la rotura celular.

La presencia del péptido señal en la secuencia del ARNm de las proteínas que siguen una vía de secreción clásica, hace que resulten fácilmente identificables mediante el uso de softwares que son capaces de analizar estas secuencias para hallar estas señales. Softwares como SignalP han probado ser muy útiles en este aspecto para los estudios de caracterización proteica, apoyado por otros softwares capaces de predecir la localización subcelular de las proteínas intracelulares como por ejemplo TargetP y ChloroP [138, 139].

Pero el secretoma no sólo se compone de péptidos secretados por la vía clásica, si no que muchas de las proteínas que lo componen carecen de péptido señal, por lo que la identificación de estas proteínas y la separación entre proteína secretada y proteína procedente de la rotura celular se complica. Para estos casos concretos se ha desarrollado un software específico (SecretomeP) capaz de identificar si una proteína se secreta por la vía no clásica mediante un cálculo de probabilidades. El desarrollo de este software se basó en la comparación de ciertas características compartidas en las secuencias aminoacídicas de proteínas que se conoce que se secretan por la vía no clásica y que no son comunes a proteínas que no se secretan (tabla 7). A cada proteína analizada se le otorga un valor (de 0 a 1, llamado NN-score) en función de la combinación de estas características observadas en su secuencia proteica, valores que se encuentren por encima de 0.5 indican que este péptido puede presentar un tipo de secreción no-clásica. Este método se encuentra en continuo perfeccionamiento y a medida que se identifiquen más proteínas secretadas por la vía no clásica se irá afinando aún más, sin embargo los porcentajes de falsos positivos obtenidos mediante este software son muy bajos [140].

Características medidas

Número de átomos calculados mediante ExPASy ProtParam *

Número de residuos cargados negativamente calculados mediante ExPASy ProtParam

Número de residuos cargados positivamente calculados mediante ExPASy ProtParam *

Punto isoeléctrico calculado mediante ExPASy ProtParam

Coefficiente de extinción calculado mediante ExPASy ProtParam

Media de hidrofobicidad calculado mediante ExPASy ProtParam

Regiones PEST ProtParam predichas mediante PESTfind

Regiones de baja complejidad predichas mediante SEG *

Estructura secundaria predicha mediante PSI-Pred

Hélices transmembrana predichas mediante TMHMM *

Glucosilaciones N-enlazadas predichas por NetNGlyc

Glucosilaciones O-enlazadas predichas por NetNGlyc

Localización subcelular predicha por PSORT *

Propiedades predichas por ProP *

Fosforilaciones de tirosina predichas por NetPhos

Fosforilaciones de serina y treonina predicha por NetPhos

Tabla 7: Lista de características analizadas para generar el método capaz de reconocer las proteínas secretadas por la vía no clásica. * Características utilizadas en el método final. Modificada de [140].

8. Proteómica como herramienta de estudio hormonal

8.1 Introducción

Hasta hace relativamente pocos años, las herramientas para el estudio de las proteínas eran demasiado caras, requerían mucho tiempo y eran poco sensibles. El desarrollo de las técnicas de ionización suave como la ionización láser asistida por matriz (MALDI) y el electrospray permitieron el estudio de macromoléculas mediante espectrometría de masas (MS). Estos métodos de ionización acoplados a diferentes detectores de masas (tiempo de vuelo TOF, cuadrupolo o trampa iónica) permiten de forma rápida y precisa la identificación y secuenciación proteica [141].

El término proteoma fue usado por primera vez en 1995 para englobar a todas las proteínas expresadas a partir del genoma. Actualmente, la definición más precisa para este término se refiere al conjunto de proteínas que componen una célula, tejido, organismo o fluido biológico en un preciso momento; incluyendo todas las modificaciones postraduccionales como glucosilaciones, sulfataciones, fosforilaciones y acetilaciones que afectan activamente a la función proteica y que no pueden ser predichas mediante la genómica o la transcriptómica. La proteómica incluye todas las tecnologías usadas para el estudio de los proteomas y pueden ser clasificadas en cuatro grupos principales:

- Herramientas para la separación y el análisis global de los proteomas; por ejemplo la electroforesis en dos dimensiones (2-DE).
- Herramientas para el análisis diferencial, como las técnicas de marcaje isotópico.
- Herramientas para la identificación de los componentes del proteoma; por ejemplo las técnicas de MALDI o electrospray.
- Herramientas bioinformáticas que permiten la identificación de las proteínas en función de su espectro de masas.

8.2 Proteómica clínica aplicada al estudio de la obesidad

La proteómica clínica supone la aplicación de técnicas y estrategias proteómicas en la medicina. Muchas de las enfermedades humanas se producen por una disregulación funcional de las interacciones proteicas, por lo que un mejor conocimiento sobre el comportamiento de las diferentes redes proteicas en diferentes enfermedades proporcionaría un mayor espectro de oportunidades para su tratamiento clínico, ya que estas redes se podrían convertir en objetivos farmacológicos en las próximas décadas. Se cree que en el futuro, las estrategias terapéuticas estarán diseñadas no sólo frente a una proteína aislada, sino frente al conjunto de proteínas que componen una célula. La importancia actual de la

proteómica en la clínica es fundamental para el descubrimiento de marcadores biológicos de diversas enfermedades, permitiendo la detección temprana de elevaciones o disminuciones de ciertos péptidos en fluidos biológicos relacionados con una enfermedad concreta, antes incluso que esta llegue a desarrollarse [142].

Al contrario que en otras disciplinas médicas, la proteómica no se ha utilizado de manera extensiva para el estudio de la obesidad. Sin embargo la publicación en el 2001 de la primera base de datos de estudios de 2-DE en diferentes tejidos de ratón (riñón, hepatocitos, músculo, tejido adiposo blanco y pardo, e islotes pancreáticos), supuso una gran herramienta de ayuda para los diferentes estudios existentes en diabetes y obesidad humana [143].

El estudio proteómico de la obesidad focalizado en el análisis de las proteínas de membrana, permitiría conocer las proteínas encargadas de la recepción de señales e implicadas en la comunicación celular, sin embargo es bien conocido que las proteínas de membrana son muy difíciles de analizar proteómicamente debido a la complejidad de su aislamiento. Por otro lado, también es muy interesante el análisis de la porción señalizadora en sí misma, las proteínas que son secretadas y que son responsables de la comunicación con otras células. Estas proteínas pueden terminar en el torrente sanguíneo y sus niveles pueden estar afectados en situaciones patológicas, por lo que podrían servir como potenciales biomarcadores en el suero. Pero desafortunadamente, la identificación de proteínas secretadas en fluidos biológicos como plasma o suero, es un proceso demasiado complicado mediante técnicas proteómicas, debido a que la mayoría de proteínas de interés y posibles candidatas a convertirse en biomarcadores se suelen encontrar en concentraciones mucho más pequeñas que otras proteínas mayoritarias (como la albúmina o las inmunoglobulinas), quedando enmascaradas por las grandes concentraciones de estas proteínas. Para evitar estos problemas se han desarrollado ciertas técnicas que permiten la eliminación previa de varias de estas proteínas mayoritarias (por ejemplo mediante inmuno-depleción), sin embargo estas técnicas tienen muchas desventajas, como la ausencia de especificidad y/o la eliminación de muchas otras especies proteicas. Por esta razón, el estudio directo del secretoma de las células y tejidos tanto *in vivo* como *in vitro*, se considera el mejor procedimiento para la identificación de potenciales biomarcadores [144, 145].

La principal desventaja del análisis del secretoma viene de la mano de proteínas contaminantes procedentes de la rotura celular que podrían estar ocultando proteínas de interés o incluso dar falsos positivos. Además, las células pueden secretar proteínas abundantes como la albúmina, o incluso, dependiendo de la técnica elegida, aparecer en los secretomas ciertas proteínas intracelulares producto del daño o la rotura celular. Hay varias estrategias para resolver estos problemas, sin embargo en estos estudios se asume que vaya a existir siempre cierta contaminación basal. En este

sentido, el tratamiento de las células con el antibiótico brefeldina A puede ayudar a identificar proteínas secretadas por la vía clásica, ya que este antibiótico bloquea el transporte vesicular del RE al aparato de Golgi [134, 146]. Otra técnica para identificar las proteínas secretadas frente a las contaminaciones es mediante el uso de metionina marcada con ³⁵S, que ayuda a detectar proteínas que han sido recién transcritas, ocultando contaminaciones por ejemplo procedentes de proteínas del suero. Más recientemente, aproximaciones proteómicas como la utilización de aminoácidos marcados con isótopos estables en cultivos celulares (SILAC), se ha destacado como una tecnología de gran potencial. Este método es extremadamente preciso y sencillo de aplicar para la cuantificación de extractos proteicos procedentes de cultivos celulares. Se basa en la comparación de cultivos celulares que usan un medio de cultivo normal (sintetizándose proteínas “ligeras”) frente a cultivos celulares incubados en medio en el cual los aminoácidos han sido reemplazados por sus equivalentes isótopos marcados (dando lugar a proteínas “pesadas”). La gran ventaja es que ambas situaciones celulares pueden ser comparadas como si se tratase de una muestra única mediante su mezcla, evitándose el riesgo de producirse errores de cuantificación durante la preparación de la muestra. Durante el análisis de espectrometría de masas, la abundancia relativa de una proteína concreta en ambas muestras, puede ser calculada por las intensidades observadas de los péptidos pesados y ligeros (figura 22) [147].

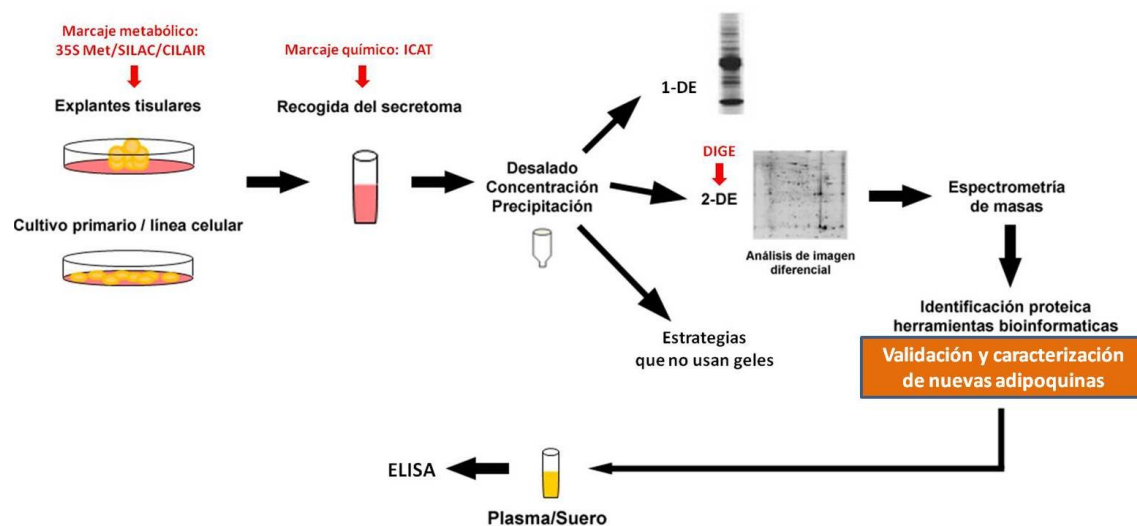


Figura 22: Representación esquemática que muestra las aproximaciones metodológicas para realizar el análisis del secretoma del tejido adiposo. Los métodos cuantitativos están indicados en rojo. Modificado de [148]

8.3 Estudios proteómicos del secretoma de tejido adiposo

8.3.1 Secretoma del TA completo

El TA es un tejido complejo y heterogéneo compuesto no sólo por adipocitos maduros, sino que también está compuesto por preadipocitos, pericitos, células endoteliales, macrófagos y linfocitos T. Bajo este contexto, es razonable aceptar que los factores secretados por la fracción del estroma vascular contribuyen al secretoma del TA y modulan la secreción de adipoquinas por parte de los adipocitos. Por tanto, la caracterización del secretoma del TA, por encima de la caracterización individual de las células que componen este tejido, podría aportar una visión más fisiológica de la función secretora de este órgano. Por otro lado, el TA presenta mayores dificultades de manejo para estos estudios, ya que existen mayores posibilidades de la aparición de contaminaciones debidas a las proteínas del suero o a proteínas intracelulares provenientes de la rotura o daño celular. Los contaminantes pueden afectar drásticamente al rango dinámico de las muestras y por tanto a la identificación de proteínas secretadas [149].

La primera caracterización del secretoma del TA humano completo mediante técnicas de proteómica fue publicado recientemente [150]. En este estudio, la recolección del secretoma del TAV fue estandarizado experimentalmente al probar diversas variaciones del protocolo hasta obtener unas concentraciones y composiciones proteicas óptimas. El protocolo final consistió en la realización de un lavado de los explantes de TAV tras 1 hora de incubación, seguido de dos o tres lavados en un periodo máximo de 8 horas, tras los cuales se incubó la muestra toda la noche. Finalmente el TA se mantuvo en cultivo durante 48-114 horas hasta obtener la muestra final. Además, para averiguar si las proteínas estaban siendo realmente secretadas, incubaron los explantes junto a un medio marcado con L-[13C6, 15N2]-Lys. De las 259 proteínas identificadas, 108 contenían péptido señal, y 70 de ellas habían incorporado el marcaje, considerándose como secretadas por el TA. Estas proteínas fueron clasificadas en cinco categorías de acuerdo con la función, la mayoría eran proteínas que formaban parte de la matriz extracelular (por ejemplo la perlecan y la versican), seguidas por un segundo grupo de proteínas relacionadas con la señalización celular (por ejemplo la neurofilina-1). Como era de esperar, este estudio también mostró como un considerable número de proteínas eran liberadas no sólo por los adipocitos, sino también participaban en la secreción otros tipos celulares como macrófagos y células endoteliales (por ejemplo endoplasmina, gelsolina, proteína disulfuro isomerasa, calreticulina, catepsina D y peroxiredoxina 4).

Los cambios cuantitativos en la secreción proteica del TAV también han sido recientemente medidos mediante el uso de la técnica de comparación de ratios de incorporación de aminoácidos marcados con isótopos estables (CILAIR), una variante

de la tecnología SILAC [149]. En este estudio, los autores determinaron el efecto de la insulina en el secretoma de explantes de TAV procedentes de un paciente mediante la comparación de los ratios de incorporación de L-[13C6]-Lys en presencia y ausencia de insulina. En este experimento descubrieron que durante el tratamiento con insulina se disminuía la secreción de proteínas relacionadas con la respuesta al estrés del RE y las encargadas de la remodelación de la matriz extracelular (ECM).

Por otro lado se realizaron análisis comparativos de los depósitos de TA epididimal entre ratas obesas y normopeso, además de los efectos del tratamiento con tiazolidinediona (TZD); marcando para ello los péptidos con 18O, y realizando cromatografía bidimensional acoplada a MS (2D-LC-MS/MS) [151]. Este estudio mostró que el TA de animales obesos libera más proteínas inflamatorias y de ECM, además de colágeno y proteasas. Además observaron que el tratamiento con TZD inhibía la secreción de estas proteínas en el TA de animales obesos, obteniendo un perfil similar al de animales normopeso.

8.3.2 Secretoma de adipocitos maduros

El primer estudio de la secreción de adipocitos maduros fue realizado después del aislamiento de adipocitos procedentes de TA epididimal, inguinal y omental de ratas [152]. En este caso también se siguió una estrategia basada en el marcaje proteolítico con 18O y 2D-LC-MS/MS, para identificar y comparar los niveles de proteínas secretadas en el medio condicionado de las células en cultivo mediante la presencia o ausencia de insulina (figura 23). De las 84 proteínas identificadas como adipoquinas, 53 nunca habían sido catalogadas como producto de la secreción del TA y de estas sólo 13 de ellas no aparecieron en estudios proteómicos posteriores. Bajo la administración crónica de insulina, se detectó la modulación de varias proteínas, por ejemplo se incrementaron los niveles de adiponectina, mientras que disminuyeron los niveles del inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1) y de la osteonectina.

El estudio de la secreción de adipocitos maduros humanos no se realizó hasta hace apenas 2 años, y para ello se utilizaron las técnicas de 2-DE y MALDI-TOF. En este estudio, la caracterización *in vitro* del secretoma de TAV humano reveló la secreción del factor derivado del pigmento epitelial (PEDF) [153] y la identificación de la dipeptidil peptidasa 4 (DDP4) como una nueva adipoquina [154]. Esta aproximación proteómica mostró que PEDF es una de las proteínas que más abundantemente libera el adipocito. La validación por otras técnicas de los resultados obtenidos mediante 2-DE y MS, demostraron que la secreción de esta proteína se encontraba regulada por la insulina y la hipoxia. Además, tras realizar ensayos *in vitro*, este grupo concluyó que la PEDF inducía la resistencia a insulina en los adipocitos y en las células musculares esqueléticas humanas; además también se le atribuyeron efectos proinflamatorios en

células musculares lisas humanas. Estos resultados confirman las conclusiones de trabajos anteriores en los que se había sugerido que la PEDF podría tener un papel importante en el desarrollo de diabetes y enfermedades relacionadas con la obesidad. Con respecto a la identificación de DDP4, los experimentos realizados llevaron a la conclusión de que los adipocitos maduros secretan más DDP4 que los preadipocitos o los macrófagos, además el TAV de individuos obesos presenta mayores niveles de esta proteína con respecto al TAS. Por otra parte, al tratar con DDP4 de cultivos de adipocitos, células musculares esqueléticas y lisas; se inhibía la ruta de señalización de la insulina. Además los niveles observados en el TA se correlacionaron positivamente con el riesgo a padecer síndrome metabólico.

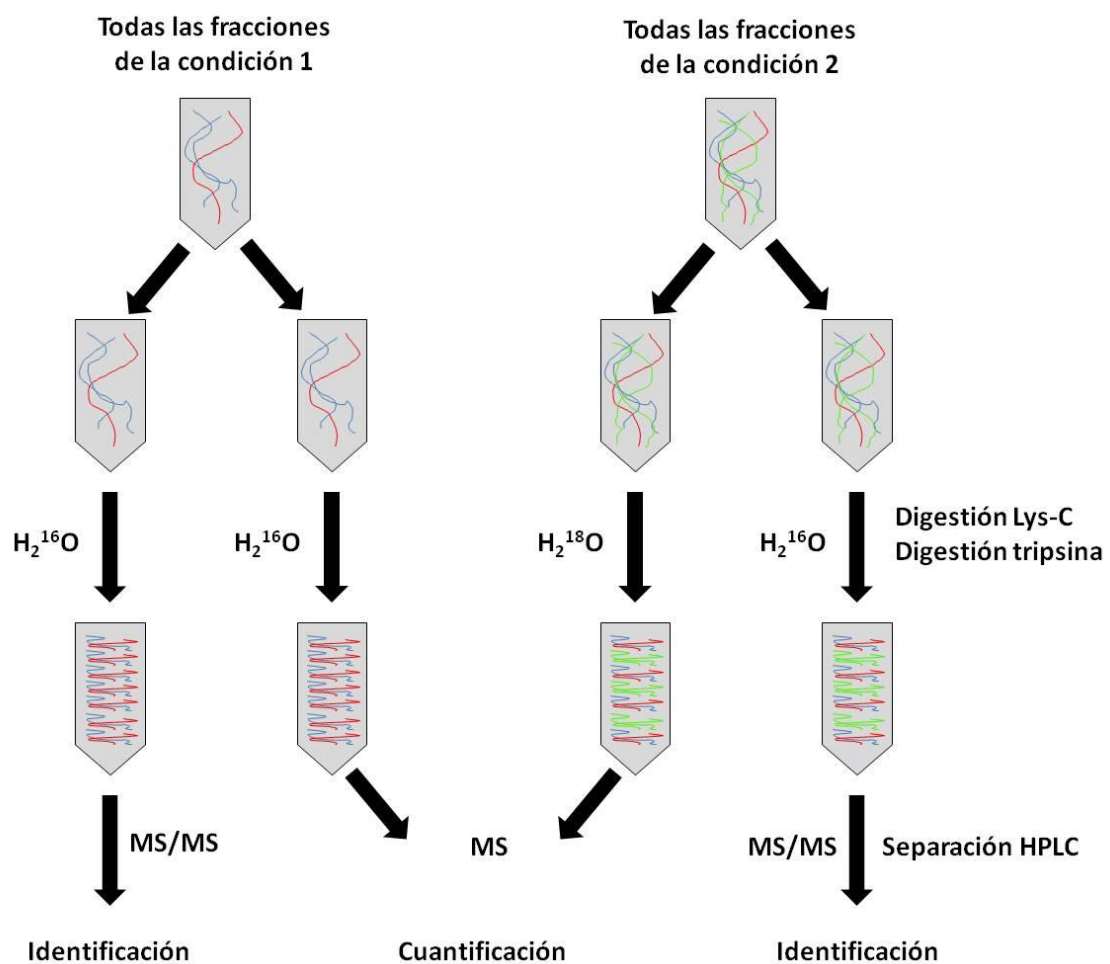


Figura 23: Diseño esquemático del experimento realizado por Chen y col. para la identificación del secretoma de adipocitos maduros [152].

8.3.3 Secretoma de la fracción EV

En el año 2007 se publicó un estudio en el que se realizaba un análisis comparativo utilizando las técnicas de 2-DE y MS/MS de la fracción del estroma vascular del TAS de mujeres bajo condiciones normales o mediante la inducción de la adipogénesis [155]. Esta investigación permitió la identificación de proteínas sin péptido señal clasificadas como citoplasmáticas como actina o lactato deshidrogenasa, y adipoquinas bien caracterizadas como la adiponectina y el PAI-1. En este trabajo también se identificaron proteínas como las serpinas, PEDF, el inhibidor de la trombina placentaria y el inhibidor de la proteasa C1.

En otro estudio se realizó un análisis diferencial del secretoma de la fracción del EV de TA epididimal procedente de ratas Zucker obesas frente al secretoma de adipocitos maduros mediante técnicas de 2D LC-MS/MS [151]. El resultado obtenido mostró que el EV y los adipocitos presentan diferentes perfiles de secreción proteica tanto cuantitativa como cualitativamente. La mayoría de las proteínas identificadas en el secretoma de la fracción del EV estaban relacionadas con la respuesta inmune, ECM y proteólisis; sugiriendo una posible función local de forma autocrina/paracrina sobre el TA. Por el contrario, los adipocitos secretan factores que participan en la regulación de actividades sistémicas.

Bajo el contexto de la medicina regenerativa, se estudió recientemente el secretoma de células madre mesenquimales derivadas de TA humano (hASC) mediante LC-MS/MS [156]. Se investigó el papel de las hASC durante procesos inflamatorios, por lo que se analizaron estas células en presencia de TNF- α . El secretoma obtenido tras el tratamiento presentaba un incremento en varios tipos de citoquinas y quimiocinas como la IL-6, IL-8, el ligando 6 de la quimiocina CXC y la proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1). La TNF- α también produjo el incremento de los niveles de varias proteasas como la catepsina L, metaloproteasas de la matriz, e inhibidores de proteasas; así como la inducción de la secreción de la pentraxina 3, implicada en la inmunidad innata.

8.3.4 Secretoma durante la diferenciación adipocitaria

Hay actualmente varios ejemplos en la literatura en los cuales se analiza el secretoma durante la diferenciación de células madre adipocitarias (o preadipocitos) con el objetivo principal de entender el proceso de adipogénesis. Apoyando todas estas aproximaciones *in vitro*, existe un estudio de predicción de expresión génica que trató de predecir el posible secretoma de preadipocitos humanos al diferenciarse. Esta predicción destacó una serie de nuevos genes candidatos relacionados con componentes de la coagulación sanguínea y del sistema fibrinolítico; además de

sugerir a la proteína gla de la matriz (MGP) y a la inhibina beta B (INHBB) como nuevas adipocinas [157].

Existe un estudio en el que se realizó una caracterización del secretoma de hASC a diferentes etapas de la diferenciación adipocitaria y osteobástica mediante 1-DE y MS/MS [158], identificando un total de 73 proteínas entre los días 0 y 3 de diferenciación. La clasificación funcional de estas proteínas indicó que la mayoría de ellas pertenecían a la matriz extracelular y a componentes del citoesqueleto, así como a proteínas de choque térmico. PAI-3 se detectó en los días 0 y 3 de la diferenciación osteoblástica, pero en ningún momento en la diferenciación adipocitaria.

La técnica SILAC se aplicó en la caracterización simultánea del proteoma y secretoma durante la diferenciación de la línea celular 3T3-L1 (figura 24) [159], identificándose proteínas presentes en trabajos previos sobre diferenciación, como la adiponectina y la lipoproteína lipasa, además de nuevas proteínas como el complejo THO 4 y el activador probable de la transcripción global 2 alpha (SNF2- α). El complejo THO, relacionado con la activación de la transcripción, se ha encontrado elevado en etapas intermedias de la adipogénesis; mientras que los niveles de SNF2- α , una proteína remodeladora de la cromatina, se encontraban disminuídos al inicio de la adipogénesis, mientras que se mantuvieron constantes en el resto de etapas.

Una estrategia similar a la anterior fue la seguida por un grupo que realizó la caracterización a distintas etapas de la diferenciación, esta vez, de cultivos primarios de preadipocitos humanos, mediante el uso de la técnica proteómica de marcaje isobárico para la cuantificación absoluta y relativa (iTRAQ) [160]. El resultado de este estudio reveló la presencia tanto de adipocinas conocidas como la de otras proteínas que no se habían encontrado previamente en otros estudios, como el glipicano 1, el factor de crecimiento derivado del hepatoma, la proteína de unión modular al calcio 1 relacionada con SPARC o el factor similar al receptor de citoquinas 1.

Finalmente, hay que destacar la aproximación cuantitativa libre de marcaje para el estudio del secretoma de la fracción del estroma vascular durante la adipogénesis mediante LC-MS/MS [161], observando que varios componentes extracelulares de las vías de señalización de Wnt y TGF-beta estaban alterados durante la adipogénesis.

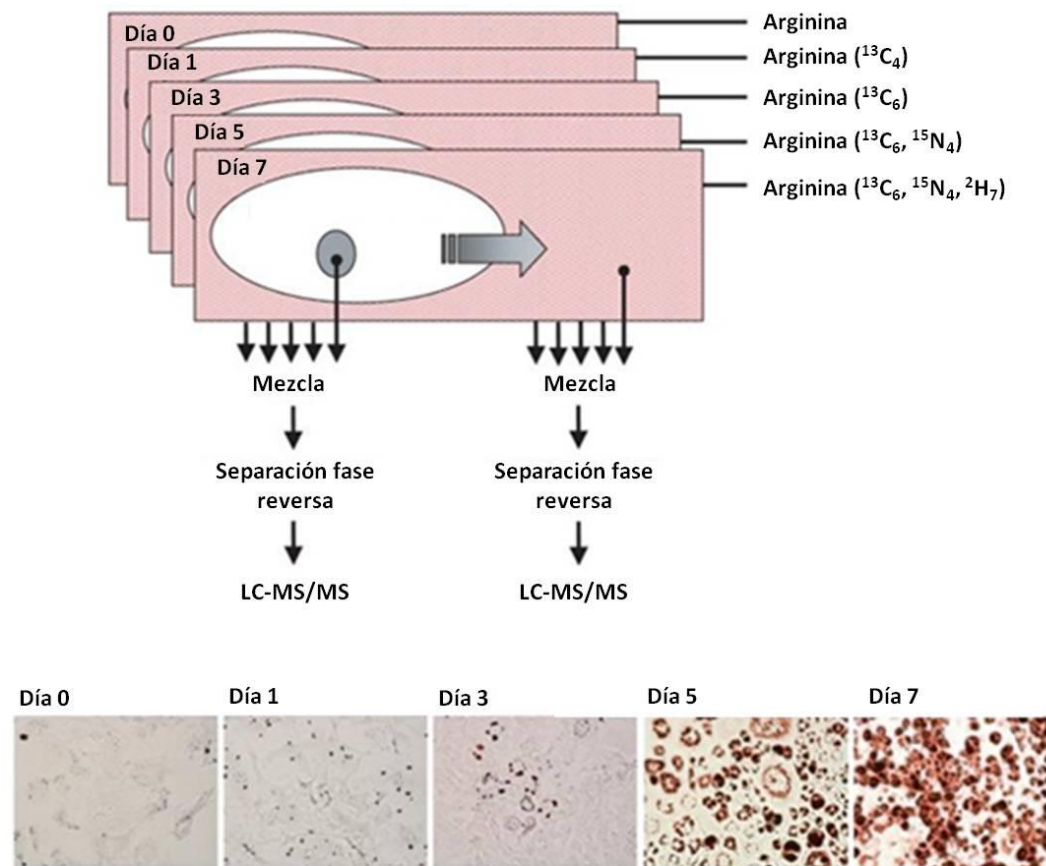


Figura 24: Estrategia de 5-plex SILAC y tinción de rojo oleoso de la diferenciación adipocitaria. Modificado de [159].

8.3.5 Secretomas de diferentes depósitos de tejido adiposo.

Existen cada vez más evidencias que muestran numerosas diferencias tanto biológicas como genéticas en el TA dependiendo de su localización anatómica [82, 162, 163]. Bajo este contexto, resultaría interesante identificar las diferencias entre los distintos tipos de depósitos de TA; y en este sentido se han realizado hasta el momento unos cuantos estudios proteómicos que se centran en las diferencias entre los proteomas específicos de los depósitos de TA [164, 165]. Sin embargo todavía hay muy pocas evidencias que muestren las diferencias en la secreción proteica de los distintos depósitos de TA.

El año pasado se publicó un estudio que indagaba entre las posibles diferencias que se podían dar entre las proteínas secretadas por el TAV frente al TAS, encontrando tres posibles proteínas secretadas que se encontrarían más elevadas en TAV, la gremlina 1 (GREM1), la pleiotrofina (PTN) y el inhibidor de la peptidasa secretora de los leucocitos 1 (SLPI) [166].

Mediante la utilización de la técnica de cromatografía de afinidad en lectinas inmovilizadas, con el fin de aislar las proteínas que presentan glucosilaciones (modificación proteica predominante en las proteínas secretadas); el grupo de Hocking y col. realizaron un análisis cuantitativo de los secretomas de explantes de TAV frente a TAS de ratón [167]. De manera adicional, también compararon el secretoma de preadipocitos y de células endoteliales microvasculares (MVECS) de ambos depósitos de TA. En este estudio no se encontraron apenas diferencias en los secretomas de los explantes completos de VAT y SAT, preadipocitos o MVECS; sin embargo describen un mayor nivel de secreción de proteínas por parte de las muestras de TAV. Este hecho es particularmente relevante, ya que el TAV constituye tan solo una pequeña parte de todo el TA corporal (alrededor del 18%) comparado con los depósitos de TAS (aproximadamente un 82%). Por otra parte, este grupo concluye que casi el 50% del secretoma de los explantes de TA está compuesto por factores con una importante implicación en la angiogénesis, sugiriendo que el TAV tiene una mayor capacidad de expansión que el TAS.

8.4 Estudios proteómicos del secretoma de tejido muscular esquelético

8.4.1 Panorama actual

El descubrimiento de las capacidades del tejido muscular esquelético para funcionar como un órgano endocrino al igual que el TA es relativamente muy reciente y por tanto apenas hay trabajos en la bibliografía que aborden la tarea de caracterizar la secreción de este tejido mediante el uso de técnicas proteómicas. En los últimos años han empezado a surgir estudios al respecto, pero centrados en el uso de cultivos de líneas celulares de músculo esquelético [168-172] y miotubos humanos [173, 174].

Hasta el momento no existen trabajos en la proteómica clínica dedicados a la caracterización de la secreción del tejido muscular esquelético mediante estrategias de explantes completos de tejido, y menos aún que centren su caracterización en diferenciar el tejido muscular por su composición de fibras.

8.4.2 Secretomas de líneas celulares condicionadas

Los primeros trabajos realizados con el afán de identificar nuevas mioquinas se basaron en el uso de líneas celulares animales condicionadas para intentar inducir la secreción proteica y comprobar los efectos de ciertas señales en el perfil secretor de las células musculares.

En un trabajo publicado en el año 2008, se realizó el estudio proteómico de la línea celular muscular de rata L6 GLUT4myc diferenciada, comparando su secreción en presencia o ausencia de insulina mediante estrategias de cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) y MS/MS para la identificación de las proteínas secretadas [168]. En este trabajo se identificaron un total de 254 proteínas, de las cuales 153 se clasificaron como secretadas. 14 proteínas se secretaron en mayores niveles durante la estimulación con insulina, incluyendo algunas proteínas relacionadas con enfermedades metabólicas, como la metaloproteinasa 2 de matriz (MMP-2) o la PAI-1. Se encontraron también 19 proteínas cuya secreción disminuía en presencia de insulina, como la proteína de unión a acil-CoA (ACBP) y la proteína morfogénica ósea 1 (BMP-1).

El mismo grupo años más tarde, siguiendo una estrategia similar, realizó una caracterización proteómica de la misma línea celular de rata en presencia o ausencia de TNF- α para tratar de averiguar si esta mioquina podría presentar un efecto de resistencia a insulina [169]. Se encontraron 28 proteínas cuya secreción estaba regulada por TNF- α , 10 de ellas con niveles elevados (por ejemplo la alfa enolasa y la proteína de unión a fosfatidiletanolamina 1) y 18 con sus niveles disminuidos en presencia de TNF- α (por ejemplo la proteína DJ-1, la peroxiredoxina 4 y la disulfuro isomerasa). Para completar este estudio realizaron un análisis por microchips de la expresión genética en muestras musculares obtenidas de ratas Zucker.

8.4.3 Secretomas durante la diferenciación de miotubos

Los estudios de la secreción durante la diferenciación adipocitaria han aportado un valioso conocimiento sobre la regulación de este proceso y el descubrimiento de nuevas adipoquinas que han ayudado a entender aún más el funcionamiento del TA. De esta forma era de esperar que una de las estrategias seguida por algunos de los investigadores intrigados por el funcionamiento del tejido muscular como órgano endocrino, fuera el estudio de la secreción proteica durante el desarrollo y diferenciación del tejido muscular esquelético.

El primer trabajo realizado al respecto, se centró en el estudio de la secreción durante la diferenciación de la línea celular miotubular de ratón C2C12 mediante electroforesis mono-dimensional y MALDI-TOF [170]. En este estudio se identificaron 80 proteínas, de las cuales 27 de ellas se clasificaron como secretadas, entre las que se encontraba la MMP-2, cistatina C y la proteína ácida secretada rica en cisteína (SPARC); ambas implicadas en la ruta de señalización de TGF- β y en el programa de diferenciación miogénica. Otras proteínas secretadas que se identificaron estaban relacionadas con la ECM, la proliferación celular, migración y señalización.

El mismo grupo completó su investigación sobre la diferenciación de C2C12 con otro trabajo publicado en 2011 en el que utilizaron una estrategia basada en la tecnología de marcaje SILAC y MS/MS (figura 25) [171]. Se identificaron 30 proteínas secretadas de manera diferencial durante el desarrollo de los miotubos, algunas de ellas de nuevo descubrimiento y que podrían tener una gran importancia biológica en el mantenimiento de la pluripotencia y la diferenciación celular. Algunas de las proteínas identificadas fueron la proteína relacionada con la folistatina 1, osteoglicina, espondina-2 y el inhibidor de apoptosis inducido por citoquinas 1.

En un trabajo similar de caracterización de la secreción de C2C12 por SILAC y MS/MS realizado un año antes [172], este grupo llegó a identificar hasta 635 proteínas secretadas por estas células, considerándose el estudio con el mayor número de proteínas secretadas por el músculo identificadas hasta el momento. Entre la ingente cantidad de proteínas secretadas, destacar 3 isoformas de la TGF- β , cuyos niveles se vieron aumentados durante la diferenciación, al igual que los factores de crecimiento similares a insulina 1 y 2. Otras proteínas identificadas serían la proteína de unión a ácidos grasos (FABP), SPARC, fibronectina o de nuevo la proteína MMP-2.

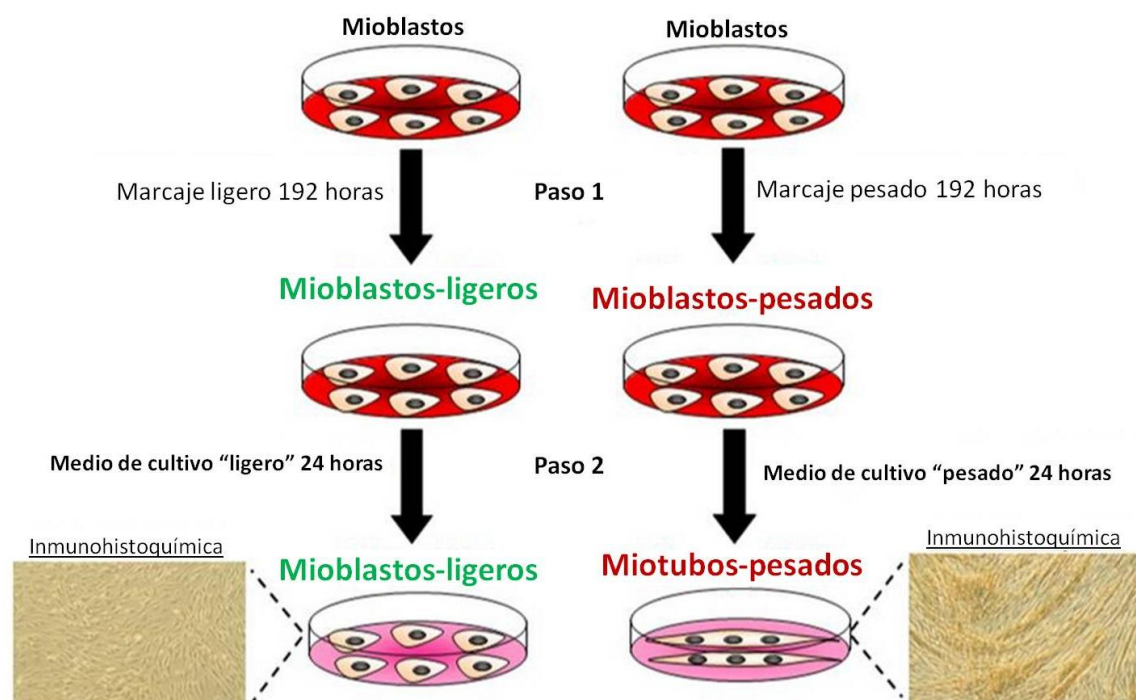


Figura 25: Estrategia de SILAC seguida por Chan y col. Para el estudio de la secreción proteica durante la diferenciación de miotubos. Modificado de [171].

8.4.4 Secretomas de células musculares humanas

Más allá de los estudios realizados en líneas celulares procedentes de animales, existen unos pocos estudios centrados en la caracterización de la secreción en células musculares humanas.

En un trabajo publicado en 2011, se utilizaron mioblastos procedentes de biopsias del músculo oblicuo interno abdominal humano para ser diferenciadas a miotubos e identificar en su secretoma nuevas proteínas secretadas con las que realizar un estudio posterior de expresión en respuesta al esfuerzo físico. Para la identificación se usaron técnicas proteómicas de electroforesis mono-dimensional y LC-MS/MS [173]. Se identificaron 18 proteínas secretadas como la fibronectina 1, gelsolina, proteína relacionada con folistatina 1 y SPARC; de las cuales 15 presentaban niveles de expresión elevados en muestras procedentes de individuos sometidos a un programa de ejercicio tras un análisis posterior de su expresión genética.

Con el objetivo de estudiar los procesos de regeneración muscular, el grupo de Le Bihan y col. se propusieron estudiar los mecanismos de comunicación intercelular durante este proceso mediante la identificación de mioquinas en mioblastos diferenciados obtenidos a partir de células satélite humanas procedentes de necropsias. Las proteínas fueron identificadas mediante 2-DE y LC-MS/MS [174]. Se encontraron 253 proteínas clasificadas en anteriores trabajos como secretadas, de las cuales 43 de ellas estaban implicadas en la miogénesis, mientras que otras se encargan de la regulación de otros tipos celulares, sugiriendo un papel importante de los mioblastos en la remodelación muscular. También caracterizaron dos tipos de microvesículas de secreción derivadas de la membrana plasmática, que pueden ayudar a entender en parte los complejos procesos de regulación de la secreción por parte del tejido muscular esquelético.

II. Objetivos

1. Establecer una serie de modelos animales tanto fisiológicos como patológicos para su uso en la caracterización de proteínas secretadas por el tejido adiposo y muscular.
2. Optimizar la técnica de obtención de secretomas de explantes de tejido adiposo y desarrollar una nueva técnica para la obtención del secretoma de explantes de tejido muscular esquelético.
3. Identificar por proteómica nuevas adipoquinas en diferentes depósitos de tejido adiposo.
4. Identificar por proteómica nuevas mioquinas en el tejido muscular esquelético.
5. Caracterizar y validar nuevas adipoquinas y mioquinas mediante el uso de los modelos animales establecidos previamente.

III. Materiales y métodos

1. Técnicas experimentales

1.1 Animales de experimentación

Los estudios fueron realizados utilizando ratas macho *Rattus norvegicus* de la cepa *Sprague-Dawley* procedentes del Animalario Central de la Universidad de Santiago de Compostela (figura 26A). El modelo de ratas *Zucker* diabéticas procede de una cepa mutante de *Rattus norvegicus* (fa/fa) (Charles River laboratories, France) (figura 26B). Los animales se mantuvieron en el animalario del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina (USC) a una temperatura estable de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y con ciclos de 12 horas luz/oscuridad. Hasta el inicio de los experimentos los animales tuvieron libre acceso a pienso comercial estándar (SAFE-Panlab, España) y agua.

Todos los protocolos de manipulación y experimentos llevados a cabo han sido aprobados previamente por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Santiago de Compostela.

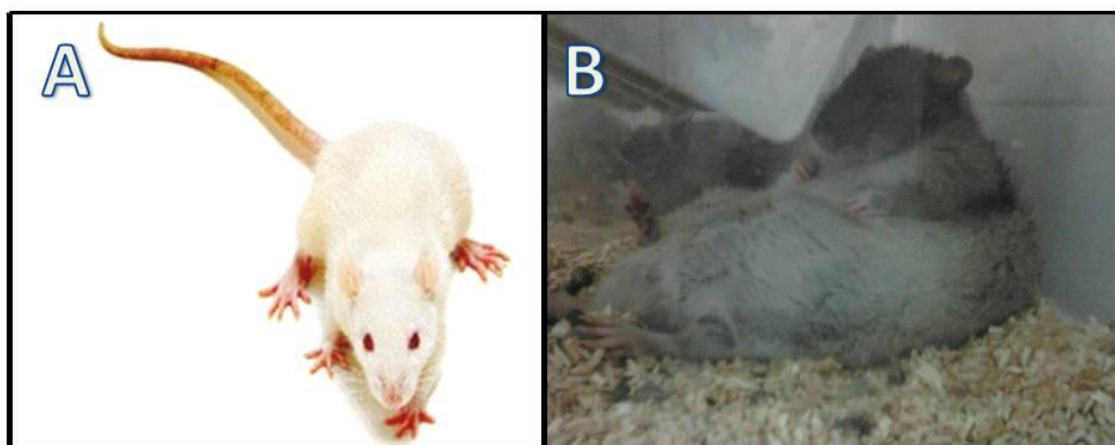


Figura 26: Las dos cepas de ratas utilizadas en este trabajo. *Sprague-Dawley* (A); rata Zucker, cepa mutante de *Rattus norvegicus* (fa/fa) (B).

1.1.2. Modelos animales

1.1.2.1 Ejercicio

Se utilizaron ratas de 6 semanas de edad (aproximadamente 160 g) y se mantuvieron estabuladas en jaulas de actividad especiales con una rueda de 40 centímetros de diámetro acoplada a un contador de vueltas (Harvard Apparatus, MA, EUA) (figura 27). Los animales estuvieron 5 días en periodo de aclimatación, tras el cual se comprobó su actividad en la rueda durante las siguientes 8 horas. Las ratas cuyo número de vueltas fue menor o mayor que la media se descartaron.

El ejercicio fue voluntario y duró 6 días durante los cuales los animales tuvieron libre acceso a comida estándar y agua. Se midió diariamente el número de vueltas, comida ingerida y peso corporal, así como la composición corporal a 0, 3 y 6 días mediante resonancia magnética nuclear (Whole Body Composition Analyzer, EchoMRI).

Como grupo control (Control Ejercicio) se utilizaron animales de las mismas características y en las mismas condiciones. Se mantuvieron durante 6 días en jaulas similares sin rueda.

Adicionalmente se realizó un modelo de ejercicio similar pero con una duración de 3 semanas de acceso libre a la rueda.

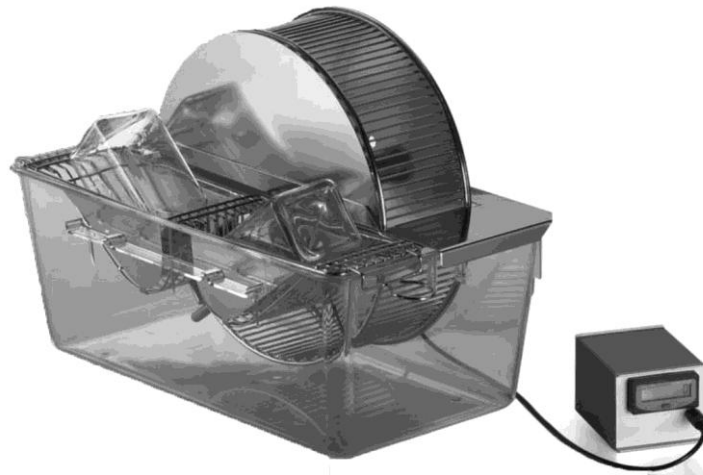


Figura 27: Imagen de la jaula de actividad con el contador de vueltas conectado.

1.1.2.2 Anorexia basada en la actividad.

La anorexia basada en la actividad (ABA) es un modelo establecido en ratas hace 50 años [175] que combina la reducción del aporte calórico con la actividad física voluntaria. Lo característico de este modelo es la rápida reducción del peso corporal a la vez que aumenta la actividad física diaria de los animales. Así, se utiliza como modelo de anorexia nerviosa humana sobre todo en estudios de comportamiento por la similitud de muchos de sus síntomas.

El diseño experimental fue equivalente al modelo de ejercicio, pero añadiendo una restricción en el acceso a pienso y a la rueda. Tras el periodo de aclimatación y adaptación a la rueda, los animales se mantuvieron durante 6 días con libre acceso a agua y a la rueda de ejercicio salvo durante el periodo de alimentación, que duró sólo una hora al día. Este periodo de alimentación fue realizado todos los días a la misma hora.

Por motivos éticos, no se permitió a los animales superar una pérdida de peso mayor del 20-30% de su peso corporal inicial. Los animales que alcanzaron esta cifra antes de los 6 días de experimento fueron descartados [176].

Como grupo de control para ABA (Control ABA) se utilizaron animales de las mismas características y en las mismas condiciones, pero sin acceso a rueda.

1.1.2.3 Obesidad inducida por la dieta.

El modelo de obesidad inducida por la dieta (DIO) se utiliza para estudiar los efectos de la obesidad producida al someter a los animales a una dieta hipercalórica alta en grasas. La singularidad de este modelo radica en que muchos de estos efectos son similares a los registrados en la obesidad humana, como son el aumento en los niveles de leptina, insulina y triglicéridos circulantes o la disminución de la sensibilidad a insulina.[177]

Se utilizaron ratas de 8 semanas de edad (aproximadamente 250 g) que tras una semana de aclimatación se dividieron en dos grupos experimentales. El primer grupo fue alimentado con una dieta alta en grasa (*High fat diet* D12492; Research Diets Inc., NJ, EUA) y el segundo grupo con una dieta estándar. La dieta alta en grasa consistía en un 60% de grasa, 20% de proteína y 20% de carbohidratos; 5.24 Kcal/g. La dieta estándar consistía en un 5,5% de grasa, 23% de proteína y 50% de carbohidratos; 3.5 Kcal/g.

Tras 10 semanas bajo este tipo de dieta las ratas fueron sacrificadas. Durante todo el experimento se registraron una vez por semana los valores de ingesta, peso y composición corporal.

1.1.2.4 Modelo de ratas Zucker diabéticas

El modelo de ratas Zucker diabéticas (ZDF) es un modelo animal de diabetes tipo 2 bien caracterizado que porta una mutación espontánea en el receptor de leptina (fa) [178], causando obesidad y resistencia a insulina. Las ratas Zucker diabéticas derivan del apareamiento endogámico entre ratas Zucker obesas, las cuales presentan obesidad y resistencia a insulina, ocasionando un fenotipo diabético a partir de la 10 semana de edad [179].

Se utilizaron ratas Zucker de 10 semanas de vida homocigotas (grupo experimental) y heterocigotas (grupo control) que en todo momento tuvieron libre acceso a dieta estándar y agua durante 12 semanas (figura 26B).

1.2 Líneas celulares

1.2.1 3T3-L1

Es una línea celular derivada de la establecida en 1962 por Todaro y Green [180] y obtenida a partir de tejido embrionario de ratones de la cepa Swiss. Presenta una morfología tipo fibroblasto y bajo condiciones apropiadas las células pueden diferenciarse a adipocitos maduros.

Las células se mantuvieron en placas de cultivo petri de 100x20 mm (BD Bioscience, NJ, EUA) en 8 ml de medio de cultivo DMEM (Lonza, Suiza) con 10% de suero fetal bovino (FBS), 100 U/ml de penicilina y 100 U/ml de estreptomycin. Para la diferenciación [181] las células se incubaron hasta llegar a confluencia, posteriormente el medio de cultivo fue suplementado con 10 µg/ml de insulina, 0.5 mM de 3 isobutil-1-metilxantina y 1 µM de dexametasona durante 2 días. Durante los siguientes 12 días, el medio fue suplementado únicamente con 10 µg/ml de insulina, cambiando el medio cada 2 días.

1.2.2 L6E9

La línea celular L6E9 es un subclón de la línea celular neonatal de rata L6 [182] utilizada en numerosos estudios relacionados con el músculo debido a su especial facilidad para diferenciarse a miotubos [183].

Las células se incubaron en placas de cultivo petri de 100x20 mm (BD Bioscience, NJ, EUA) a baja densidad en el mismo medio de cultivo descrito para 3T3-L1. Para inducir la diferenciación a miotubos, las células se mantuvieron hasta llegar a confluencia, posteriormente se incubaron durante 8-10 días en 8 ml de medio de cultivo DMEM con sólo un 2% de FBS.

1.2.3 Secretomas de líneas celulares 3T3-L1 y L6E9

Se retiró el medio de la placa de cultivo y se lavaron las células varias veces con cuidado con el tampón HAM, intentando eliminar todo rastro de FBS que se había utilizado para suplementar el medio de cultivo. Inmediatamente se incubaron las células durante 24 horas (para la línea 3T3-L1) o 12 horas (para la línea L6E9) en medio DMEM sin FBS ni rojo fenol (Lonza, Suiza) y suplementado con 100 U/ml de penicilina y 100 U/ml de estreptomycin.

Al día siguiente se recogió el medio de cultivo en filtros de ultracentrifugación (Amicon Ultra 3kDa cut off, Millipore, Billerica, EUA) y se concentró hasta un volumen de entre 100-250 µl centrifugando a 3500 rpm a 4°C.

1.3 Extracción de tejido adiposo humano

Todas las muestras procedentes de humanos fueron obtenidas de los pacientes tras haber firmado un consentimiento informado aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de Galicia (CEIC de Galicia) de acuerdo con la Declaración de Helsinki.

El tejido adiposo se extrajo de pacientes obesos (índice de masa corporal superior a 35) sometidos a una operación quirúrgica de gastrectomía por laparoscopia gracias a la colaboración del Servicio de Cirugía del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela. El TAV extraído se localiza en la región hipogástrica (alrededor de los órganos internos) y el TAS en la región mesogástrica.

Los tejidos se transportaron desde el quirófano al laboratorio en el tampón Krebs-Ringer-Hepes (KRH) estéril suplementado con penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 µg/ml.

1.4 Extracción de tejidos procedentes de animales

Todos los tejidos de los animales fueron extraídos cuidadosamente en el quirófano del animalario, minimizando todo lo posible las contaminaciones, en especial el pelo de las ratas. Se utilizó material quirúrgico previamente esterilizado.

- Los tejidos destinados a experimentos de secreción se transportaron al laboratorio en el tampón KRH estéril con penicilina (100 U/ml) y estreptomicina (100 µg/ml) a temperatura ambiente. Posteriormente se procesaron para eliminar cualquier contaminante mediante lavados sucesivos en KRH en condiciones estériles (campana de flujo laminar).
- Los tejidos destinados a estudios de proteína intracelular y mensajero fueron congelados en hielo seco en el mismo quirófano y almacenados posteriormente a -80°C en el laboratorio.
- Los tejidos destinados a inmunohistoquímica se introdujeron en un tubo tipo Falcon de 50 ml envueltos en una gasa quirúrgica empapada en suero fisiológico y se trasladaron inmediatamente al laboratorio a temperatura ambiente.

1.4.1 Localización de los tejidos extraídos

- El tejido adiposo blanco se seleccionó de tres localizaciones distintas:
 - TAVo: Localizado en la cavidad peritoneal, alrededor de las vísceras (figura 28A).
 - TAVg: Tejido adiposo unido a los testículos (figura 28B).
 - TAS: Situado bajo la piel de las ingles (figura 28C).
- El Tejido adiposo pardo se extrajo de la región subcutánea del área supraclavicular (figura 28D).
- En el caso del tejido muscular esquelético, se seleccionaron dos tipos musculares distintos situados en la pata del animal:
 - Sóleo: Caracterizado por poseer mayoría de fibras tipo I (oxidativas lentas) (figura 28E).
 - Gastrocnemio: Con mayoría de fibras tipo II (glucolíticas rápidas) (figura 28F).

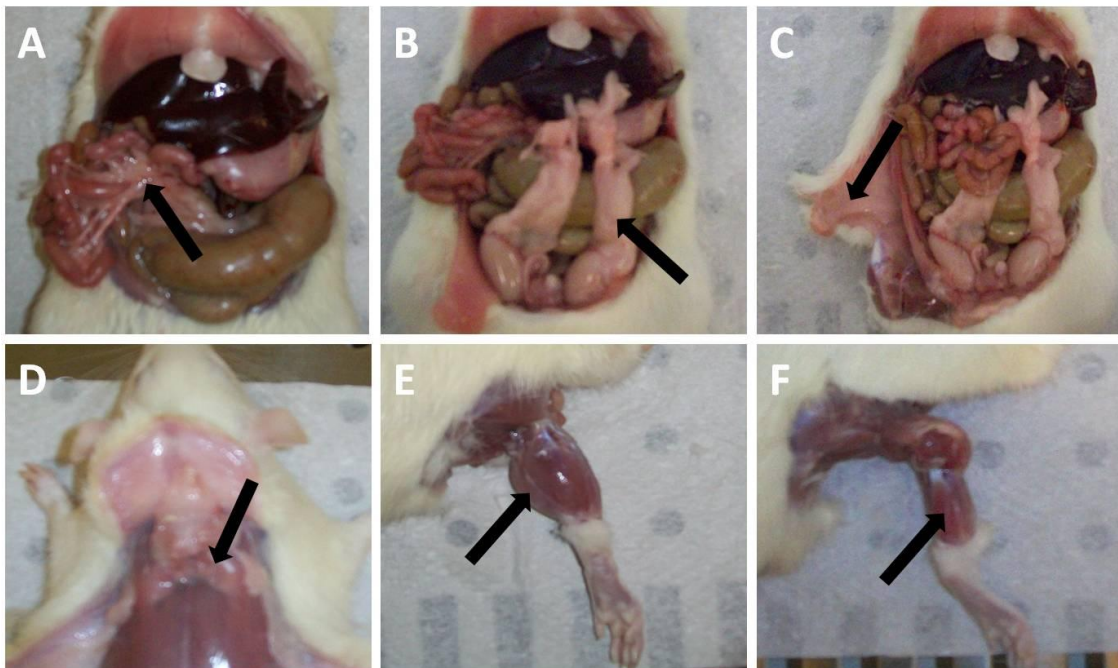


Figura 28: Localización de los tejidos extraídos en rata. TAVo (A); TAVg (B); TAS (C); TAP (D); Gastrocnemio (E); Sóleo (F).

1.4.2 Cultivos de explantes

El protocolo de cultivo de explantes se basó en el desarrollado por Álvarez-Llamas en 2007 para el estudio del secretoma del TAV humano [150].

Una vez extraídos los tejidos (los cuales presentaron pesos similares según el tipo), se realizó una serie de preincubaciones con el fin de acondicionar el tejido para el experimento de secreción y eliminar en la medida de lo posible todos los

contaminantes presentes en el tejido, tanto sangre como componentes intracelulares procedentes de la rotura celular. Inicialmente los tejidos fueron incubados en placas de cultivo de 6 pocillos (Iwaki, Tokio, Japón) con 5 ml de medio DMEM sin rojo fenol ni suero y suplementado con una mezcla de penicilina (100 U/ml) y estreptomicina (100 µg/ml). El medio de cultivo se cambió cada 2 horas dos veces y una más a las 16 horas. Finalmente se añadieron 3 ml de medio fresco a los tejidos y se incubaron durante 24 horas (tejido adiposo) y 12 horas (tejido muscular esquelético) (figura 29). Tras este tiempo, se recogió el medio de cultivo (secretoma), se centrifugó para eliminar células que se pudieran haber desprendido y se congeló a -80°C hasta su uso, o se procedió directamente a su procesado.

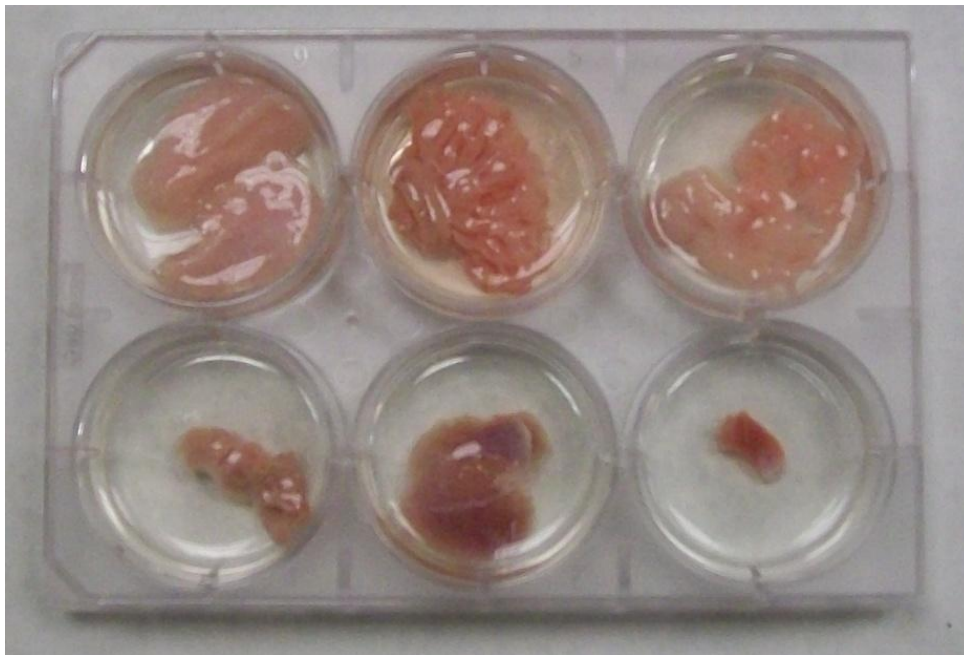


Figura 29: Foto del cultivo de diferentes explantes tisulares. De izquierda a derecha y de arriba abajo: TAS, TAVo, TAVg, TAP, gastrocnemio y sóleo.

1.5 Establecimiento de cultivos primarios en tejido adiposo blanco.

1.5.1 Dispersión tisular

Tras la extracción de tejido adiposo blanco, se lavó varias veces en tampón fosfato salino (PBS) estéril para eliminar los posibles restos de sangre, se colocaron aproximadamente 5 gramos de tejido en una placa petri con 10 ml de medio DMEM-F12 (Lonza, Suiza) y con la ayuda de dos bisturíes se cortó el tejido en trozos de aproximadamente 1 mg para poder ser recogidos utilizando una pipeta pasteur (dispersión mecánica).

Se recogieron los trozos y el medio de la placa en un tubo tipo Falcon de 50 ml al que se le añadió colagenasa tipo I 0.2% (Gibco, CA, EUA). El volumen final se llevó a 20 ml con medio DMEM-F12 y se incubó la muestra a 37 °C en agitación de 30 a 60 minutos (dispersión enzimática).

1.5.2 Separación de las fracciones celulares

Una vez realizada la dispersión, se filtró el homogenado con un filtro de 100 µm de diámetro de poro (BD Biosciences, NJ, EUA), con ayuda de una pipeta pasteur se pasó a un tubo nuevo tipo Falcon de 50 ml y se llevó a un volumen de 20 ml con medio DMEM-F12 fresco suplementado con un 5% de suero fetal bovino. La muestra se centrifugó a 1800 rpm durante 10 minutos.

Tras la centrifugación se observaron varias fases bien diferenciadas (figura 30):

- Capa transparente/amarilla: Grasa liberada por las células rotas.
- Fase blanca (inmediatamente debajo): Adipocitos maduros intactos.
- Fase acuosa: Medio de cultivo libre de células.
- Pellet: Fracción celular del estroma de tejido adiposo más las células que se han roto y restos de tejido sin disgregar que han pasado por el filtro.

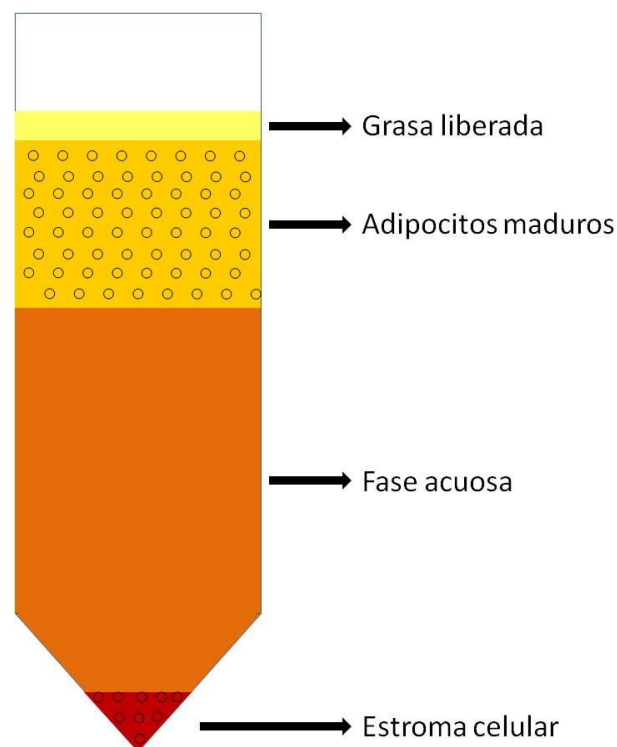


Figura 30: Representación de las distintas capas resultantes de la digestión enzimática.

1.5.2.1 Obtención de los adipocitos maduros

Se recogió la fase blanca intermedia tras retirar con cuidado la fase amarilla y se transfirió a un tubo tipo falcon de 50 ml con 10 ml de medio DMEM-F12. Se centrifugó a 950 rpm durante 10 minutos y se recogió nuevamente la fase blanca, la cual se congeló directamente a -80°C o se preparó para los experimentos de secreción.

1.5.2.2 Obtención de las células del estroma del tejido adiposo.

Tras la separación de las distintas fracciones celulares del tejido adiposo, se aislaron las células del pellet con la ayuda de un filtro de 40 µm de diámetro de poro (BD Biosciences, NJ, EUA) y se pasaron a un tubo nuevo tipo Falcon de 50 ml con 10 ml de medio DMEM-F12. Las células se centrifugaron a 950 rpm durante 10 minutos y se eliminó el sobrenadante por decantación. Se volvió a añadir 10 ml de medio DMEM-F12 y se centrifugó de nuevo a 950 rpm durante 10 minutos.

Tras eliminar el sobrenadante, el pellet se resuspendió en 5 ml de medio DMEM-F12 suplementado con un 10% de suero fetal bovino y se sembraron aproximadamente 1.000.000 de células en una paca petri de 100x20 mm (BD Bioscience, NJ, EUA); se dejaron asentar entre 24-48 horas tras lo cual, según el volumen final de células asentadas observado con ayuda de un microscopio óptico, se levantaron y se repartieron en varias placas petri.

Las células se mantuvieron en cultivo 10 pases, hasta el quinto pase aproximadamente hubo mezcla de preadipocitos, macrófagos y otros tipos celulares que componen el estroma; pero a partir del sexto pase, la mayoría de las células presentes eran preadipocitos (figura 31).

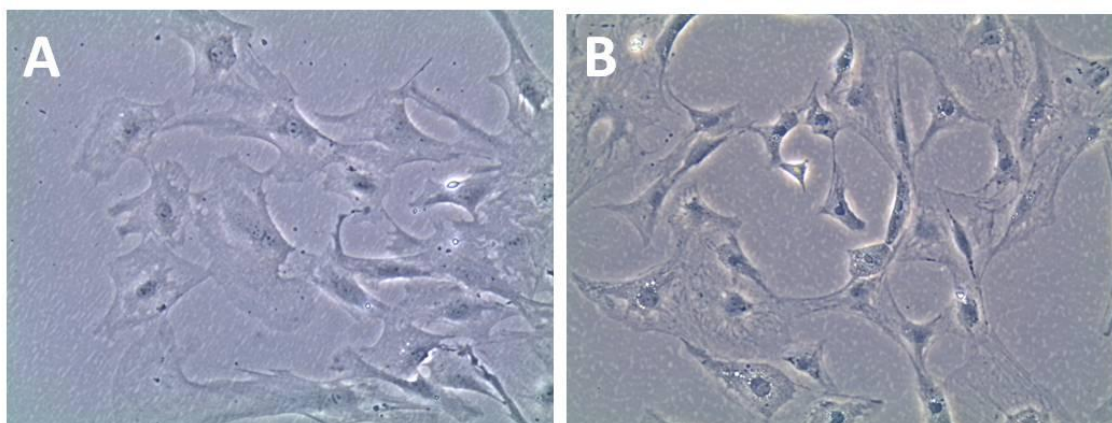


Figura 31: Imagen de preadipocitos aislados de TAB tras el sexto pase tomada con un microscopio óptico invertido de campo claro. A: TAS, B: TAVo.

1.6 Secretomas de cultivos primarios de tejido adiposo

1.6.1 Adipocitos maduros

Una vez aislada la capa blanca de adipocitos maduros tras la dispersión, se resuspendieron las células en 5 ml de medio DEMEM-F12 sin suero y se incubaron durante 24 horas a 37°C en agitación. Tras este tiempo, se centrifugó el tubo a 950 rpm durante 10 minutos y se eliminó el sobrenadante con las células, este paso se realizó dos veces. El sobrenadante obtenido se concentró mediante el uso de un filtro de ultracentrifugación (Amicon Ultra 3kDa cut off, Millipore, Billerica, EUA) hasta un volumen de unos 100-250 µl y se congeló a -80°C o se procesó para su posterior utilización.

1.6.2 Células del estroma de tejido adiposo

Dependiendo del tipo de células al que iban destinados los experimentos de secreción, se seleccionaron pases tempranos (menos de 5 pases), para testar el conjunto de células aisladas del estroma; o pases tardíos (más de 6 pases) para testar la secreción de los preadipocitos.

El protocolo seguido fue similar al realizado en los secretomas para líneas celulares, la única variación seguida fue usar medio DMEM-F12 en lugar de DMEM sin rojo fenol.

2. Métodos analíticos

2.1 Estudios de proteína

2.1.1 Extracción de proteínas totales en líneas celulares y cultivos primarios

2.1.1.1 Secretomas

Los secretomas recogidos fueron concentrados y desalados mediante el uso de filtros de ultracentrifugación hasta un volumen de entre 100-250 µl centrifugando a 3500 rpm a 4°C, tras este paso, los secretomas se procesaron según el tipo de técnica a la que estarían destinados:

- Las muestras destinadas a la técnica de inmunodetección se usaron directamente tras ser concentradas.
- Las muestras destinadas a técnicas proteómicas, tras ser concentradas y desaladas se precipitaron utilizando un kit basado en el método de precipitación modificado de ácido tricloroacético/acetona (2-DE Clean Up kit, GE, Uppsala, Suiza). Posteriormente fueron resuspendidas en tampón de carga para

electroforesis bi-dimensional (tampón 2D) tal y como se describe en el apartado de Técnicas Proteómicas.

En ambos casos, los secretomas de todos los tejidos se concentraron hasta un volumen total de 0.1 ml (a partir de los 3 ml iniciales).

2.1.1.2 Proteína intracelular

Se retiró el medio de cultivo y se lavó la placa 2 veces con el tampón KRH frío. A continuación se añadieron 250 µl por placa de tampón de lisis RIPA (tampón de radioinmunoprecipitación) [Tris pH 7.4 200mM, NaCl 130 mM, Glicerol 10%, SDS 0.1 %, Tritón X-100 1%, MgCl₂ 10 mM, con antifosfatasas y antiproteasas comerciales a una dilución 1/100 (Ref. P0044 y P8340. Sigma-Aldrich, MO, EUA)] y se dejó la placa en hielo durante 30 minutos agitando cada cierto tiempo.

Pasado este tiempo, se usó un raspador a lo largo de toda la placa hasta despegar todas las células; con la ayuda de una jeringa de 1 ml con aguja de insulina (30G de grosor) se pasaron a un tubo eppendorf. Este paso se repitió 8 veces con la jeringa para conseguir romper aquellas células que todavía se mantenían intactas. Finalmente se centrifugaron los lisados a 14000 rpm durante 10 min a 4°C y se guardó el sobrenadante a -80°C hasta su uso.

2.1.2 Extracción de proteínas totales en tejido

2.1.2.1 Secretomas:

Los secretomas recogidos fueron concentrados y desalados mediante el uso de filtros de ultracentrifugación hasta un volumen de entre 100-250 µl centrifugando a 3500 rpm a 4°C, tras este paso, los secretomas se procesaron según el tipo de técnica a la que estarían destinados, de una forma similar a lo descrito para los secretomas de líneas celulares y cultivos primarios.

2.1.2.1 Proteína intracelular.

Se separaron aproximadamente 0.1 g de tejido (TA o muscular) en un tubo *eppendorf* de 2 ml con 0.25 ml de tampón de lisis RIPA. Los tejidos se homogeneizaron mecánicamente utilizando un *TissueLyser II* (Quiagen, Tokio, Japón) y posteriormente se centrifugaron a 14000 rpm durante 30 minutos a 4 °C. Se recogió el sobrenadante y se guardó a -80 °C.

2.1.3 Cuantificación de proteína

La cuantificación se realizó mediante el kit *RC DC Protein Assay* (Biorad, CA, EUA), apto para muestras procesadas con tampones que contienen detergentes y reductores como el uso de ditioneol, urea o tiourea, que pueden afectar a la determinación proteica por otros métodos.

En el caso de los secretomas, la cuantificación de la proteína total sirvió a su vez para comprobar la viabilidad del método de obtención de los mismos, ya que se partió del supuesto de que tejidos del mismo peso y tipo, bajo condiciones y tiempos de incubación iguales, deberían secretar cantidades similares de proteínas al medio extracelular.

2.1.4 Inmunodetección mediante *Western Blot*

Se inmunodetectaron las proteínas de interés mediante la técnica analítica *Western blot* donde las proteínas de una muestra se separan por su peso molecular tras ser sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida. Después de su separación las proteínas se transfirieron electroforéticamente a una membrana de nitrocelulosa donde fueron detectadas con anticuerpos específicos contra la proteína a estudio.

2.1.4.1 Preparación de la muestra

La cantidad total de proteína de la muestra usada varió entre 25 y 50 μg dependiendo del tipo de anticuerpo usado y la disponibilidad de muestra. Las cantidades totales se prepararon en el mismo tampón en el que están diluidas las muestras para obtener un volumen total de 20 μl al que finalmente se le añadió 5 μl de tampón Laemmli concentrado 5 veces [SDS 10 % (p/v), Tris pH 6.8 400mM, Glicerol 50%, Azul de bromofenol 0.5% y B-mercaptoetanol 5%].

Tras la añadir el tampón, las muestras se hirvieron al baño María durante 5 minutos para desnaturalizar las proteínas; en el caso de que no se fueran a utilizar inmediatamente debieron ser almacenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso, volviendo a hervirse tras ser descongeladas. En el caso de muestras de secretomas diluidas en tampón 2D, estas no se hirvieron en ningún momento debido a la presencia de urea en el tampón, que carbamila las proteínas a altas temperaturas.

Para las muestras de plasma o suero, se usaron 5 μl de muestra diluida en 20 μl de tampón de carga sin concentrar y se hirvieron durante 5 minutos antes de ser cargadas en el gel.

2.1.4.2 Electroforesis monodimensional (1-DE)

Se utilizó la electroforesis desnaturante en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE), siguiendo el método descrito por Laemmli [184].

Los geles se prepararon en dos fases:

- Fase separadora: Los porcentajes de acrilamida variaron según el tamaño de la proteína que queríamos separar. Se prepararon a partir de soluciones stock de acrilamida/bisacrilamida (29:1) 30%, Tris pH 8.8 1.5M y SDS 10%.
- Fase concentradora: El porcentaje de acrilamida fue siempre constante (5%). Se prepararon a partir de soluciones stock de acrilamida/bisacrilamida (29:1) 30%, Tris pH 6.8 1M y SDS 10%.

A ambas fases se les añadió al final APS y TEMED como catalizadores de la polimerización.

Las muestras se hirvieron durante 5 minutos antes de cargarse en el gel (a excepción de las muestras diluidas en tampón 2D como se ha comentado antes). Se dejó una calle libre en donde se cargó una mezcla de proteínas con pesos moleculares conocidos (Precision Plus Protein Standard, Bio-Rad, CA, EUA) para determinar el peso de las proteínas analizadas.

La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 60 v durante 15 minutos y posteriormente se dejó a 90 v constantes hasta el final de la separación en el tampón de electroforesis (Tris base 25 mM, Glicina 192 mM y SDS 0.1%).

2.1.4.3 Transferencia

La transferencia de proteínas procedentes de un gel de poliacrilamida hacia membranas de nitrocelulosa de 0.45 μm (Bio-Rad, CA, EUA) se realizó utilizando el método de transferencia húmeda a 200 mA constantes y 4°C durante 1 hora, si la proteína testada tiene un peso inferior a 40 kDa, y durante 2 horas si es mayor.

El tampón de transferencia se preparó con Tris base 25 mM, Glicina 192 mM y Metanol 20%.

2.1.4.4 Tinción con rojo Ponceau S

Se comprobó la eficacia de la transferencia tiñendo las proteínas transferidas a las membranas con 0.1 % de rojo Ponceau S en 1 % de ácido acético diluido en agua destilada. Se lavó el exceso con solución de lavado PBS-T [Tris pH 8 20 mM, NaCl 150 mM y Tween-20 0.3%; Sigma-Aldrich, MO, EUA] y se escaneó la membrana con un escáner Canoscan 4400F (Canon, Japón) a una resolución de 600 ppp. Las imágenes

obtenidas sirvieron a su vez como control de carga, ya que en la mayoría de los casos estudiados no se pudo encontrar una proteína secretada de forma constitutiva como ocurre con la β -actina o la GAPDH a nivel intracelular.

A continuación las membranas se lavaron varias veces con solución de lavado para eliminar todos los restos de la tinción antes del paso de bloqueo.

2.1.4.5 Bloqueo de la membrana

Una vez transferidas las proteínas a la membrana, se bloquearon los sitios inespecíficos de unión del anticuerpo. Dependiendo de las especificaciones del anticuerpo usado para la inmunodetección, se bloqueó 1 hora en agitación con leche en polvo desnatada comercial (Dietisol) al 5% o con BSA 5% (Sigma-Aldrich, MO, EUA), ambos preparados en PBS-T.

2.1.4.6 Inmunodetección

Tras el bloqueo de la membrana, se incubó con el anticuerpo específico contra la proteína a detectar diluido en solución de bloqueo durante toda la noche en agitación a 4°C.

Al día siguiente se hizo un lavado de 1 hora en agitación con solución de lavado y posteriormente se incubó 45 minutos con el anticuerpo secundario correspondiente diluido en solución de bloqueo (tabla 8).

Tras la incubación, se lavó la membrana 1 hora con solución de lavado y se indujo la reacción de quimioluminiscencia mediante la incubación con el sustrato *ECL Western Blotting Substrate* (Thermo Scientific, MA, EUA). Para la visualización se utilizaron placas radiográficas *Mamoray* (Agfa Healthcare, Bélgica), que se revelaron utilizando la máquina reveladora XR 24 Pro (Dürr Dental, Alemania).

2.1.4.7 Cuantificación

Una vez reveladas las placas se escanearon a una resolución de 600 ppp (CanonScan 4400F; Canon, Japón) y las bandas se densitometraron mediante el programa ImageMeter (Flashscript.biz).

Anticuerpo Primario	Peso molecular	Casa comercial	Dilución	Anticuerpo secundario	Bloqueo	Casa Comercial	Dilución
B-Actina	42 kDa	Sigma-Aldrich	1:5000	anti-ratón	Leche 5%	Thermo Scientific	1:5000
GHS-R1	44 kDa	Santa Cruz Biotechnology	1:1000	anti-cabra	Leche 5%	Santa Cruz Biotechnology	1:5000
LEPR	100/125 kDa	Abcam	1:1000	anti-conejo	Leche 5%	Thermo Scientific	1:5000
Leptina	16 kDa	Santa Cruz Biotechnology	1:1000	anti-conejo	Leche 5%	Thermo Scientific	1:5000
Galectina-1	14 kDa	Santa Cruz Biotechnology	1:1000	anti-conejo	Leche 5%	Thermo Scientific	1:5000
Adiponectina	30 kDa	Santa Cruz Biotechnology	1:1000	anti-cabra	Leche 5%	Santa Cruz Biotechnology	1:5000
IL-6	25 kDa	Santa Cruz Biotechnology	1:1000	anti-cabra	BSA 5%	Santa Cruz Biotechnology	1:5000
DJ-1	22 kDa	Cell Signaling	1:1000	anti-conejo	Leche 5%	Thermo Scientific	1:5000
FABP-3	15 kDa	Santa Cruz Biotechnology	1:1000	anti-ratón	Leche 5%	Thermo Scientific	1:5000
Fetuina A (policlonal)	59 kDa	Santa Cruz Biotechnology	1:1000	anti-cabra	Leche 5%	Santa Cruz Biotechnology	1:5000
Fetuina A (monoclonal)	59 kDa	R&D Systems	1:1000	anti-ratón	Leche 5%	Thermo Scientific	1:5000
FNDC5 (forma larga)	25 kDa	Abcam	1:2000	anti-conejo	BSA 5%	Thermo Scientific	1:5000
FNDC5/irisina (forma corta)	25 kDa	Phoenix Pharmaceuticals	1:500	anti-conejo	BSA 5%	Thermo Scientific	1:2500
UCP-1	33 kDa	Abcam	1:2000	anti-conejo	Leche 5%	Thermo Scientific	1:5000
PGC1- α	90 kDa	Santa Cruz Biotechnology	1:2000	anti-conejo	BSA 5%	Thermo Scientific	1:5000
GAPDH	36 kDa	Applied Biosystems	1:2000	anti-ratón	Leche 5%	Thermo Scientific	1:5000

Tabla 8: Lista de anticuerpos primarios con sus correspondientes anticuerpos secundarios utilizados en este trabajo.

2.1.5 Inmunoensayo enzimático (ELISA) para fetuina A

El ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) 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. 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 la proteína fetuina A se determinaron en el plasma y los secretomas de las ratas utilizando para ello un kit comercial de ELISA (Uscn Life Science Inc., TX, EUA). Como paso previo fue necesario realizar una serie de diluciones de las muestras. Para las muestras de plasma se realizó una dilución 1:1000, mientras que para muestras de secretoma se diluyeron 1:20; ambas utilizando el diluyente proporcionado por el kit.

El protocolo seguido fue el especificado en las instrucciones del kit. La cuantificación se realizó a 450 nm mediante un lector *VersaMax ELISA Microplate Reader* (Molecular Devices, CA, EUA)

2.1.6 Radioinmunoensayo (RIA)

Para la determinación de insulina, leptina y grelina se usó la técnica de Radioinmunoensayo. Este procedimiento se basa en la competencia de unión a un anticuerpo específico que se establece entre la hormona a cuantificar (libre) y cantidades conocidas de la misma marcada con un isótopo radiactivo. De esta forma, cuanta más hormona libre, menor será la unión de la marcada al anticuerpo y viceversa.

2.1.6.1 RIA Ghrelina

Los niveles circulantes de ghrelina se determinaron en el plasma de las ratas mediante la utilización de un kit comercial de radioinmunoensayo (Linco research Inc., MO, EUA). Los reactivos utilizados fueron los siguientes:

- Hormona marcada: I¹²⁵-Ghrelina. 302 µCi/µg
- Curva estándar de 8 puntos: 10 pg/ml a 1000 pg/ml
- Anticuerpo: Anti-ghrelina obtenido en cobaya
- Tampón de ensayo: Fosfato 0.01M, EDTA 0.01M, azida sódica 0.08%, y gelatina pH 6.85
- IgG de suero de cobaya obtenido en cabra
- Reactivo precipitante: IgG de suero de cobaya obtenido en cabra, polietilenglicol 3% y Triton X-100 0.05% diluido en fosfosalino 0.05M, EDTA 0.025M y azida sódica 0.08%.

Primer día: Se pipetearon 300 µl de tampón de ensayo a los tubos NSB, 200 µl a los TB y 100 µl al resto de los tubos del ensayo excepto a los TC. A continuación se añadieron 100 µl de los estándares, controles de calidad y muestras a los tubos correspondientes (todos por duplicado). Seguidamente se añadieron 100 µl de anticuerpo a todos los tubos excepto los TC y NSB. La mezcla se agitó y se dejó cubierta durante toda la noche a 4°C (tabla 9).

Segundo día: Se añadieron 100 µl de hormona marcada a todos los tubos. Agitar la mezcla, cubrir e incubar toda la noche a 4°C.

Tubo	Tampón de ensayo	Muestra/curva	Anticuerpo ghrelina	Ghrelina (I-125)	Suero de cobaya	Reactivo precipitante
Cuentas totales (TC)	-	-	-	100 µl	-	-
Unión no específica (NSB)	300 µl	-	-	100 µl	10 µl	1.0 ml
Uniones totales	200 µl	-	100 µl	100 µl	10 µl	1.0 ml
7, 8	100 µl	100 µl de 10 pg/ml	100 µl	100 µl	10 µl	1.0 ml
9, 10	100 µl	100 µl de 20 pg/ml	100 µl	100 µl	10 µl	1.0 ml
11, 12	100 µl	100 µl de 50 pg/ml	100 µl	100 µl	10 µl	1.0 ml
13, 14	100 µl	100 µl de 100 pg/ml	100 µl	100 µl	10 µl	1.0 ml
15, 16	100 µl	100 µl de 200 pg/ml	100 µl	100 µl	10 µl	1.0 ml
17, 18	100 µl	100 µl de 500 pg/ml	100 µl	100 µl	10 µl	1.0 ml
19, 20	100 µl	100 µl de 1000 pg/ml	100 µl	100 µl	10 µl	1.0 ml
21, 22	100 µl	100 µl de 2000 pg/ml	100 µl	100 µl	10 µl	1.0 ml
23, 24	100 µl	100 µl de Control de calidad 1	100 µl	100 µl	10 µl	1.0 ml
25, 26	100 µl	100 µl de Control de calidad 2	100 µl	100 µl	10 µl	1.0 ml
27-n	100 µl	100 µl de muestra	100 µl	100 µl	10 µl	1.0 ml

Tabla 9: Distribución de los tubos del ensayo para la detección de ghrelina y reactivos añadidos a cada uno.

Tercer día: Se añadieron 10 µl de IgG de suero de cobaya a todos los tubos excepto a los TC. Posteriormente se añadieron 1.0 ml de reactivo de precipitación frío (4°C) a todos los tubos excepto a los TC. Se agitó la mezcla y se incubó durante 20 minutos a 4°C. Finalmente todos los tubos excepto los TC se centrifugaron a 3000 g durante 20 minutos. Se eliminó el sobrenadante por decantación dejando el precipitado seco.

La radiactividad del precipitado se midió mediante un contador γ (Wizard 1470, Wallac). Las concentraciones de ghrelina se calcularon automáticamente utilizando el programa RIAcalc-LBK (Wallac)

2.1.6.2 RIA Insulina

Los niveles circulantes de insulina se determinaron en el plasma de las ratas mediante la utilización de un kit comercial de radioinmunoensayo (Linco research Inc., MO, EUA). Los reactivos utilizados fueron los siguientes:

- Hormona marcada: I¹²⁵-Insulina. 367 µCi/µg

- Curva estándar de 7 puntos: 0.1 ng/ml a 10 ng/ml
- Anticuerpo: Anti-insulina obtenido en cobaya
- Tampón de ensayo: fosfosalino pH 7.4 0.05M, EDTA 0.025M, azida sódica 0.08%, y BSA 1%.
- Reactivo precipitante: IgG de suero de cobaya obtenido en cabra, polietilenglicol 3% y Triton X-100 0.05% diluido en fosfosalino 0.05M, EDTA 0.025M y azida sódica 0.08%.

Tubo	Tampón de ensayo	Muestra/curva	Anticuerpo Anti-insulina	Insulina (I-125)	Reactivo precipitante
Cuentas totales (TC)	-	-	-	100 µl	-
Unión no específica (NSB)	200 µl	-	-	100 µl	0.1 ml
Uniones totales (TB)	100 µl	-	100 µl	100 µl	0.1 ml
7, 8	-	100 µl de 0.1 ng/ml	100 µl	100 µl	0.1 ml
9, 10	-	100 µl de 0.2 ng/ml	100 µl	100 µl	0.1 ml
11, 12	-	100 µl de 0.5 ng/ml	100 µl	100 µl	0.1 ml
13, 14	-	100 µl de 1.0 ng/ml	100 µl	100 µl	0.1 ml
15, 16	-	100 µl de 2.0 ng/ml	100 µl	100 µl	0.1 ml
17, 18	-	100 µl de 5.0 ng/ml	100 µl	100 µl	0.1 ml
19, 20	-	100 µl de 10.0 ng/ml	100 µl	100 µl	0.1 ml
21, 22	-	100 µl de Control de calidad 1	100 µl	100 µl	0.1 ml
23, 24	-	100 µl de Control de calidad 2	100 µl	100 µl	0.1 ml
25, 26	-	100 µl de muestra	100 µl	100 µl	0.1 ml
27-n	-	100 µl de muestra	100 µl	100 µl	0.1 ml

Tabla 10: Distribución de los tubos del ensayo para la detección de insulina y reactivos añadidos a cada uno.

Primer día: Se pipetearon 200 µl de tampón de ensayo a los tubos NSB y 100 µl a los TB. A continuación se añadieron 100 µl de los estándares, controles de calidad y muestras a los tubos correspondientes (todos por duplicado). Seguidamente se añadieron 100 µl de hormona marcada a todos los tubos, y 100 µl de anticuerpo excepto los tubos TC y NSB. La mezcla se agitó y se dejó cubierta durante toda la noche a 4°C (tabla 10).

Segundo día: Se añadieron 0.1 ml de reactivo de precipitación frío (4°C) a todos los tubos excepto a los TC. Se agitó la mezcla y se incubó durante 20 minutos a 4°C. Finalmente todos los tubos excepto los TC se centrifugaron a 3000 g durante 20 minutos. Se eliminó el sobrenadante por decantación dejando el precipitado seco.

Se midió la radiactividad del precipitado y se calcularon las concentraciones de insulina del mismo modo que para el RIA de ghrelina.

2.1.6.3 RIA Leptina

Los niveles circulantes de leptina se determinaron en el plasma de las ratas mediante la utilización de un kit comercial de radioinmunoensayo (Linco research Inc., MO, EUA). Los reactivos utilizados fueron los siguientes:

- Hormona marcada: I¹²⁵-leptina. 135 µCi/µg.
- Curva estándar de 7 puntos: 0.05 ng/ml a 10 ng/ml.
- Anticuerpo: Anti-leptina obtenido en cobaya.
- Tampón de ensayo: fosfosalino pH 7.4 0.05M, EDTA 0.025M, azida sódica 0.08%, y BSA 1% y triton-X 0.05%.
- Reactivo precipitante: IgG de suero de cobaya obtenido de cabra, polietilenglicol 3% y Triton X-100 0.05% diluido en fosfosalino 0.05M, EDTA 0.025M y azida sódica 0.08%.

Tubo	Tampón de ensayo	Muestra/curva	Anticuerpo leptina	Leptina (I-125)	Reactivo precipitante
Cuentas totales (TC)	-	-	-	100 µl	-
Unión no específica (NSB)	300 µl	-	-	100 µl	1.0 ml
Uniones totales	200 µl	-	100 µl	100 µl	1.0 ml
7, 8	100 µl	100 µl de 0.05 ng/ml	100 µl	100 µl	1.0 ml
9, 10	100 µl	100 µl de 0.1 ng/ml	100 µl	100 µl	1.0 ml
11, 12	100 µl	100 µl de 0.2 ng/ml	100 µl	100 µl	1.0 ml
13, 14	100 µl	100 µl de 0.5 ng/ml	100 µl	100 µl	1.0 ml
15, 16	100 µl	100 µl de 1.0 ng/ml	100 µl	100 µl	1.0 ml
17, 18	100 µl	100 µl de 2.0 ng/ml	100 µl	100 µl	1.0 ml
19, 20	100 µl	100 µl de 5.0 ng/ml	100 µl	100 µl	1.0 ml
21, 22	100 µl	100 µl de 10.0 ng/ml	100 µl	100 µl	1.0 ml
23, 24	100 µl	100 µl de Control de calidad 1	100 µl	100 µl	1.0 ml
25, 26	100 µl	100 µl de Control de calidad 2	100 µl	100 µl	1.0 ml
27-n	100 µl	100 µl de muestra	100 µl	100 µl	1.0 ml

Tabla 11: Distribución de los tubos del ensayo para la detección de leptina y reactivos añadidos a cada uno.

Primer día: Se pipetearon 300 µl de tampón de ensayo a los tubos NSB, 200 µl a los TB y 100 µl al resto de los tubos del ensayo excepto a los TC. A continuación se añadieron 100 µl de los estándares, controles de calidad y muestras a los tubos correspondientes (todos por duplicado). Seguidamente se añadieron 100 µl de hormona marcada a todos los tubos, y 100 µl de anticuerpo excepto los tubos TC y NSB. La mezcla se agitó y se dejó cubierta durante toda la noche a 4°C (tabla 11).

Segundo día: El protocolo para este día fue similar al seguido para el RIA de insulina.

Se midió la radiactividad del precipitado y se calcularon las concentraciones de leptina del mismo modo que para el RIA de ghrelina.

2.1.7 Inmunohistoquímica

Se usó la técnica de inmunohistoquímica para determinar la presencia de fibras rápidas (miosina rápida) o lentas (miosina lenta) en el tejido muscular esquelético. Para ello, las muestras de tejido a estudio se enviaron a la Plataforma de Inmunohistoquímica disponible en el Servicio de Anatomía Patológica-Dpto. Ciencias Morfológicas (CHUS). Allí las muestras se congelaron en isopentano, previamente enfriado en nitrógeno líquido, y se cortaron utilizando un criostato. Se montaron secciones de 10 µm de ancho en portaobjetos *FLEX IHC* (Dako, Glostrup, Dinamarca) para realizar la inmunodetección de forma automática mediante un *AutostainerLink 48* (Dako).

El protocolo seguido fue el siguiente:

- 5 min de bloqueo con *EnVision FLEX peroxidase-blocking reagent* (Dako).
- 30 min de incubación con el anticuerpo monoclonal de ratón para miosina lenta (Novocastra, Newcastle, UK) con una dilución 1/10, y el anticuerpo monoclonal de ratón para miosina rápida (Novocastra) a una dilución 1/20 en un corte contiguo.
- 20 min de incubación con *EnVision FLEX/HRP* (polímero de dextrano conjugado con peroxidasa de rábano y anticuerpos frente a ratón y conejo).
- 10 min de revelado con *tetrahidrocloruro de 3,3'-diaminobenzidina* (DAB) (Dako). Tras este paso se tiñeron los núcleos durante 9 minutos con *EnVision FLEX hematoxilina* (Dako).

Las preparaciones fueron observadas y fotografiadas utilizando para ello un microscopio óptico de campo claro.

2.2 Estudios de expresión (ARNm): PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR)

Para la determinación de la expresión genética se utilizó la qRT-PCR. La reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR, *reverse transcription polymerase chain reaction*) es una variante de la PCR en la cual una hebra de ARN se

retrotranscribe a ADN complementario utilizando la enzima transcriptasa inversa, amplificándose este ADN mediante una PCR en tiempo real.

La PCR en tiempo real permite cuantificar de manera absoluta el producto de la reacción de PCR mediante el uso de sondas Taqman (sondas específicas marcadas con fluorocromos: donador y aceptor), cuyo sistema de detección se basa en la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia (FRET) entre las dos moléculas.

2.2.1 Extracción RNA-Trizol

- 0.1 g de tejido (adiposo o muscular) almacenado a -80°C se introdujo en un eppendorf con 800 μl de agente Trizol[®] (Invitrogen, CA, EUA) y una o dos bolas de metal para ser homogenizado mecánicamente mediante un homogenizador automático "TissueLyser II" (Quiagen, Japón) a 30 Hz durante 3 minutos.
- Tras la homogenización, la muestra se centrifugó a 12000 g durante 10 minutos a 8°C y se recogió el sobrenadante en un eppendorf limpio.
- Se añadieron 160 μl de cloroformo por cada 800 μl de Trizol, se agitó el eppendorf por inversión y se incubó alrededor de 3 minutos hasta verse bien diferenciadas las dos capas.
- Posteriormente se centrifugó a 12000 g durante 15 minutos a 4°C , se recogió el sobrenadante en otro eppendorf nuevo con cuidado de no tocar la interfase blanquecina (proteínas).
- Se añadieron 400 μl de isopropanol por cada 800 μl de Trizol, se agitó el eppendorf por inversión y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente.
- A continuación, se centrifugaron a 12000 g durante 10 minutos a 4°C (a partir de esta centrifugación la muestra debe permanecer siempre en hielo). Se eliminó el sobrenadante por decantación con mucho cuidado de no arrastrar el pellet. Posteriormente se añadieron 800 μl de etanol al 75% diluido en H_2O DEPC (H_2O bidestilada con dietilpirocarbonato al 0.1%) por cada 800 μl de Trizol.
- Se centrifugó a 7500 g durante 5 minutos a 4°C , se eliminó el sobrenadante decantando el eppendorf con cuidado de no arrastrar el pellet. Una vez seco, se resuspendió el pellet en 25 μl de H_2O DEPC.
- Finalmente se cuantificó en un *NanoDrop 2000c Spectrophotometer* (Thermo Scientific, MA, EUA)

2.2.2 Tratamiento con DNAsas

- Se siguió el protocolo del kit comercial Ambion® DNA-free™ (Life Technologies, CA, EUA)
- Para el tratamiento se calculó el volumen necesario para retrotranscribir 2 µg de RNA en un volumen máximo de 12,5 µl de H₂O DEPC.
- Se preparó una mezcla con 1.5 µl del tampón proporcionado por el kit comercial y 1 µl de DNasa I, y se añadió a la muestra. Se incubó el eppendorf en el termociclador *Illumina Eco Real Time PCR System* (Cultek S.L.U., España) durante 30 minutos a 37 °C. Tras la incubación se pasó directamente el eppendorf a hielo.
- Se añadieron 2 µl del reactivo de inactivación de la DNasa y se incubó 3 minutos a temperatura ambiente.
- Tras este tiempo se centrifugó la muestra a 1000 g durante 1.5 minutos y se pasaron 10 µl de sobrenadante a otro eppendorf.
- Finalmente se continuó con la retrotranscripción (la muestra puede ser congelada a -80 °C en el caso de no usarse tras el tratamiento con DNAsas)

2.2.3 Retrotranscripción

Se utilizó el kit comercial *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, CA, EUA).

Lo primero que se hizo fue preparar una mezcla conteniendo 2 µl de tampón de retrotranscripción 10x, 0.8 µl de mezcla de dNTP al 20x (100 mM), 2 µl de cebadores de retrotranscripción aleatorios, 1 µl de *MultiScribe Reverse Transcriptase* y 4.2 µl de H₂O DEPC.

Se pipetearon 10 µl de la mezcla sobre los 10 µl de la muestra y se colocó en el termociclador con el programa:

10 minutos a 25 °C / 120 minutos a 37 °C / 5 minutos a 85 °C / 4 °C hasta la recogida de la muestra.

2.2.4 qRT-PCR

Se utilizó el kit comercial TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG (Applied Biosystems, CA, EUA).

Siempre que se realizó para un gen o un tejido por primera vez fue requisito necesario hacer una prueba de las diluciones apropiadas. Se probaron las siguientes diluciones:

Sin diluir (2 µl de cDNA + 7 µl de H₂O DEPC) / 1:50 / 1:500 / 1:5000

Para dar por buenas las diluciones debería haber 3 ciclos aproximadamente entre una y otra; en este estudio se escogió aquella dilución que caía entre los 20-30 CT (*cycle threshold*, ciclo umbral). Una vez escogida la dilución se preparó la mezcla por gen usado en placas de 96 pocillos (tanto para el gen problema como para el gen constitutivo), en la que en cada pocillo irían 1 µl de primer y 10 µl de la *Master Mix* proporcionada por el kit. El gen constitutivo usado fue HPRT y todas las muestras se analizaron por duplicado (Tabla 12).

A la mezcla de cada pocillo se les añadieron 9 µl del ADN complementario correspondiente obtenido tras la retrotranscripción. Se selló la placa con un adhesivo óptico y se centrifugó a 3000 rpm durante 1 minuto. Finalmente la placa se introdujo en el equipo de PCR a tiempo real (Step One Plus Real-Time PCR System; Applied Biosystems, CA, EUA), utilizando el protocolo estándar de 2 horas de duración. Los resultados se analizaron utilizando el software proporcionado por el aparato.

(Applied Biosystems, CA, EUA)	Referencia
HPRT	Rn01527840-m1
Fetuna a	Rn00563700-m1
IL-6	Rn01410330-m1
DJ-1	Rn01516683-m1
FABP-3	Rn00377366-m1
FNDC5	Rn01519161-m1
PGC1-α	Rn00580241-m1

Tabla 12: Lista de cebadores utilizados en este trabajo.

2.3 Estudios de composición corporal: Imagen por resonancia magnética (IRM)

Para realizar las medidas de la composición corporal se utilizó un sistema de imagen por resonancia magnética que proporciona medidas precisas de los parámetros de composición corporal: grasa corporal total, masa de tejido magro, fluidos corporales, y agua corporal total en ratas y ratones de hasta 700 gramos sin la necesidad de anestesia o sedación. (Whole Body Composition Analyzer, EchoMRI Echo Medical Systems, TX, USA). Las mediciones se realizaron en los animales a distintos tiempo según modelo experimental, permitiendo conocer los valores en gramos del total de tejido adiposo, así como de tejido magro (masa muscular libre de tejido adiposo) corporal de las ratas (figura 32).



Figura 32: Imagen del aparato de imagen por resonancia magnética EchoMRI (foto tomada de www.echomri.com).

2.4 Estudios metabólicos

2.4.1 Determinación de glucosa en sangre

Se utilizó un medidor de glucosa Accu-CHEK sensor (Roche, Suiza) para determinar los valores de glucosa en sangre obtenida a través de un fino corte realizado con un bisturí en la cola de las ratas tras 20 horas en ayunas.

2.4.2 Modelo de evaluación de la homeostasis (índice HOMA)

Se utilizó este método para cuantificar la resistencia a insulina y el porcentaje remanente de células β (beta). Fue descrito por primera vez por el Dr. Matthews y colaboradores en el año 1985 [185]. Este procedimiento está basado en la relación que existe entre la concentración de insulina en suero y la concentración de glucosa en sangre según la siguiente ecuación:

$$\text{Índice HOMA} = \frac{\text{Insulina} \left(\frac{\text{pmol}}{\text{l}} \right) * \text{glucosa} \left(\frac{\text{mmol}}{\text{l}} \right)}{22,5}$$

Así, los valores elevados de índice HOMA indican baja resistencia a insulina y viceversa.

Los valores de insulina se obtuvieron en suero de ratas mediante la técnica de RIA, mientras que los valores de glucosa en sangre se obtuvieron gracias a un medidor de glucosa tal y como se describe en apartados anteriores.

2.5 Análisis estadístico

Salvo cuando se indica lo contrario (Ej. Análisis de imagen en estudios proteómicos), el análisis estadístico se realizó mediante el software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc, CA, EUA). En concreto los datos fueron analizados utilizando el test no paramétrico *Mann-Whitney*, considerando una $p < 0.05$ como significativo y una $p < 0.01$ como muy significativo. Los resultados se expresaron como media \pm SEM.

3. Técnicas proteómicas

Todas las técnicas que se describen a continuación fueron hechas en la Unidad de Proteómica del Hospital Clínico Universitario de Santiago (Fundación Ramón Domínguez/Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago). En concreto los pasos previos a la identificación por espectrometría de masas se realizaron en la sala blanca de dicha unidad bajo presión positiva minimizando así la contaminación de las

muestras por queratinas de la piel/pelo, u otras proteínas que podrían enmascarar la identificación de las proteínas a estudio. Todo el análisis posterior por espectrometría de masas así como la interpretación de resultados y la creación de tablas con todas las proteínas identificadas fue realizado por la responsable de la Unidad (Dra. Jana Alonso).

3.1 Electroforesis bidimensional (2-DE)

Se utilizaron las muestras de proteína procedentes de los secretomas obtenidos y procesados según se ha descrito en este capítulo, resuspendidas en tampón de carga 2D (urea 5M, thiourea 2M, tributilfosfina 2mM, ditiotreitól (DTT) 65mM, CHAPS 65 mM y NDSB-256 0.15 mM; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

Mediante esta técnica las muestras se separaron en dos fases o dimensiones: Punto isoelectrico (pI) y masa molecular (Mw) (figura 33).

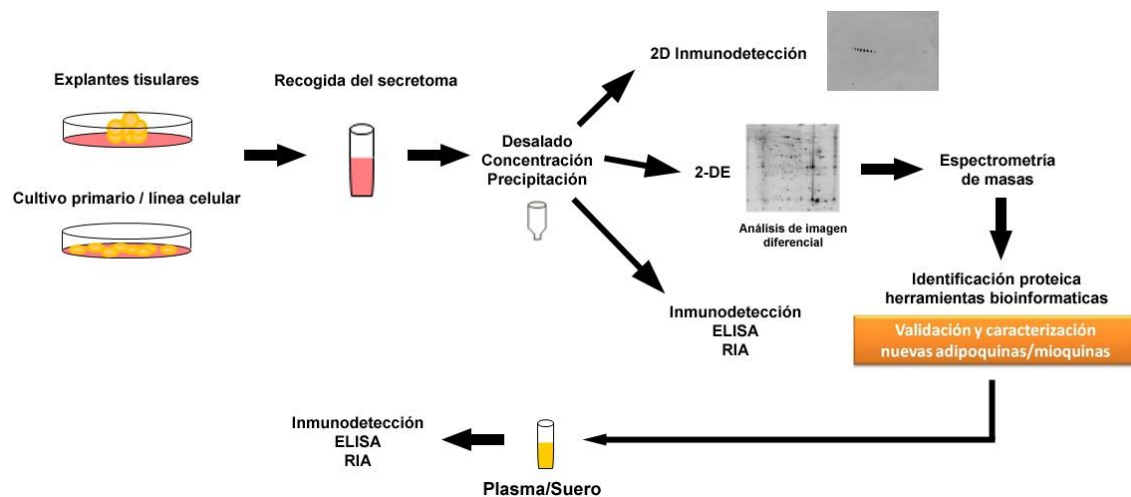


Figura 33: Esquema del flujo de trabajo llevado a cabo para el estudio de la secreción proteica mediante herramientas proteómicas. Modificado de [148]

3.1.1 Primera dimensión: Isoelectroenfoque (IEF)

En esta primera fase se separan las proteínas en función de su pI mediante la aplicación de un campo eléctrico a lo largo de una tira del 4% de poliacrilamida con un gradiente de pH inmovilizado.

En este trabajo se utilizaron tiras comerciales ReadyStrip™ IPG Strips (Bio-Rad, CA, EUA) de 7 y 17 cm de longitud con rangos de pH que van de 4 a 7 (rango medio), y de 3 a 10 (rango largo).

Tamaño tira	Cantidad de proteína	pH	Anfolitos
7 cm	125 µg	4-7	0,2 % pH 4-7
		3-10	0,2 % total (25 % pH 2-4, 50 % pH 3-10, 25 % pH 9-11)
17 cm	350 µg	4-7	0,2 % pH 4-7
		3-10	0,2 % total (25 % pH 2-4, 50 % pH 3-10, 25 % pH 9-11)

Tabla 13: Distintos tipos de tiras comerciales utilizadas en este trabajo. Cantidad de proteína cargada, rango de pH y porcentaje de anfolitos añadidos a la muestra.

Previamente a cargar las muestras, se añadió una mezcla de anfolitos SERVALYT™ (SERVA Electrophoresis, Alemania) (tabla 13). Para asegurar la correcta disolución de los anfolitos, se usó un vortex y se centrifugó la muestra durante 5 minutos a máxima velocidad. Para la carga en las tiras se utilizaron bandejas de rehidratación (*Rehydration/Equilibration Trays*; Bio-Rad, CA, EUA) donde primero se pipeteó la muestra a lo largo del carril de la bandeja, y posteriormente se colocó la tira con el gel hacia abajo de forma que todo el gel quede en contacto con la muestra. Tras 5 minutos, se cubrió completamente la tira con aceite mineral para evitar la deshidratación (Bio-Rad, CA, EUA) y se dejó hidratar de forma pasiva toda la noche a temperatura ambiente.

Al día siguiente, la tira se colocó en la bandeja de isoelectroenfoco (*Focusing Tray*, Bio-Rad, CA, EUA) correspondiente a su longitud usando pequeños papeles de filtro humedecidos con agua ultrapura para facilitar el contacto entre la tira y los electrodos. Se cubrió la tira por completo con aceite mineral y se introdujo la bandeja en el aparato de isoelectroenfoco *Protean IEF Cell* (Bio-Rad, CA, EUA) (figura 34) a la que se le aplicó el programa establecido por la casa comercial correspondiente al tamaño de la tira usado (tabla 14).

Fases del IEF	7 cm	17 cm
Fase de condicionamiento	15 minutos a 250 V	
Fase de incremento del voltaje	Rápido incremento hasta los 4000 V	Rápido incremento hasta los 10000 V
Fase de enfoque	Incremento de 4000 V a 20000 V	Incremento de 4000 V a 60000 V
Fase de mantenimiento	500 V hasta la retirada de la tira	
Temperatura del proceso	20 °C	
Duración aproximada del proceso	5-6 horas	8-10 horas

Tabla 14: Descripción de las distintas fases del que se compone el programa de isoelectroenfoco para los distintos tamaños de tira usados, duración del proceso y temperatura al que se lleva a cabo.

Una vez finalizado el programa, se retiró la tira, se secó el exceso de aceite mineral en papel de filtro y se almacenó en la bandeja de rehidratación boca arriba a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de realizar la electroforesis.

En el caso de los análisis diferenciales, todo el proceso se realizó simultáneamente para todas las muestras que iban a ser utilizadas en un mismo análisis.



Figura 34: Imagen del aparato de isoelectroenfoque *Protean IEF Cell* utilizado para este estudio.

3.1.2 Segunda dimensión: SDS-PAGE

La electroforesis de la segunda dimensión fue realizada utilizando un método similar al descrito para la 1-DE. Para ello se prepararon geles de poliacrilamida del tamaño correspondiente a la longitud de la tira de IEF usada variando los porcentajes de acrilamida según el tipo de proteínas a resolver:

- 10% para proteínas grandes.
- 15% para proteínas pequeñas.
- 12% para obtener una resolución intermedia (usado en los estudios diferenciales).

En este caso no se preparó una fase concentradora como ocurría en los geles monodimensionales, sino que la zona superior debía presentar una superficie lisa perfectamente alineada con la horizontal con espacio suficiente como para poder colocar encima la tira de IEF (figura 35).

Antes de depositar las tiras sobre los geles de acrilamida, estas se incubaron durante 20-30 minutos en tampón de equilibrado (glicerol 30%, Tris 1M (pH 6,8), DTT 2%, SDS 2%, urea 4M, tiourea 2M, azul de bromofenol y H₂O ultrapura).

Tras el equilibrado, se cubrió la superficie superior del gel con agarosa 0.5% en tampón de electroforesis precalentada a 95°C para inmediatamente colocar la tira de IEF sobre la superficie del gel de acrilamida. Así la agarosa consigue el contacto total entre la tira y el gel. Se esperó unos minutos a que polimerizara la agarosa y se introdujo el gel en la cubeta de electroforesis. La electroforesis se realizó a un amperaje constante de 35 mA, con refrigeración líquida a 17°C (figura 36D) y se mantuvo hasta que el frente visible, gracias al azul de bromofenol, llegó a la parte inferior del gel.



Figura 35: Dibujo esquemático de la segunda dimensión.

En el caso de los análisis diferenciales, tanto los geles como la electroforesis se realizaron simultáneamente para todos los geles que se iban a utilizar en el mismo análisis (figuras 36B y 36C).

3.1.3 Tinción de geles de geles de poliacrilamida

3.1.3.1 Tinción de proteínas con azul de coomassie.

El gel obtenido tras la segunda dimensión, se separó de los cristales y se depositó en una cubeta con una disolución de azul de coomassie 0.1% (Serva Electrophoresis, Alemania), metanol 45%, ácido acético 7.5% y H₂O ultrapura de forma que las

proteínas se tiñan a la vez que se fijan al gel. La incubación con esta tinción se mantuvo en agitación toda la noche.

Al día siguiente, se lavaron todos los restos de azul de bromofenol no unido a las proteínas con una mezcla de metanol 45%, ácido acético 7.5% y H₂O ultrapura; y se mantuvo el gel en agitación durante media hora. Tras esto, se sustituyó la mezcla por H₂O ultrapura y se fotografió el gel utilizando un aparato *Molecular Imager® VersaDoc™ MP 4000 System* (Biorad, CA, EUA) (figura 37A).

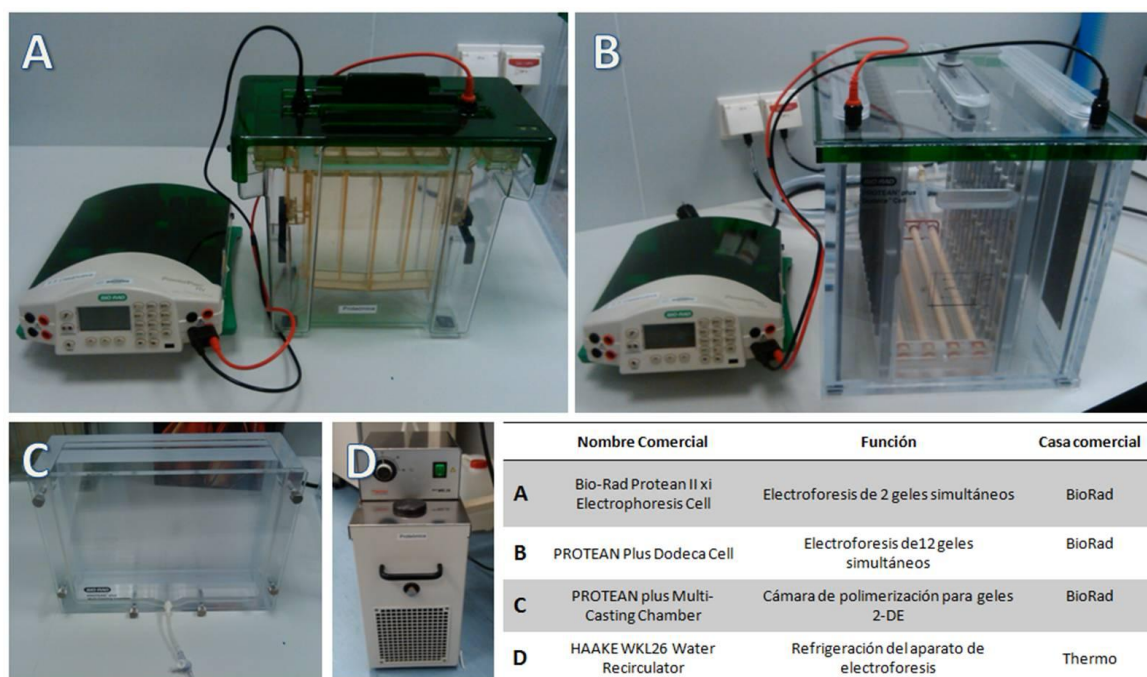


Figura 36: Imagen y descripción de los principales aparatos utilizados en la segunda dimensión.

3.1.3.2 Tinción de proteínas con fluorescencia (*Sypro Ruby*)

El gel obtenido tras la segunda dimensión, se separó de los cristales y se depositó en una cubeta con una solución de fijación compuesta por metanol 10%, ácido acético 7% y H₂O ultrapura. El gel se mantuvo en agitación durante una hora; tras este tiempo la solución se sustituyó por el colorante fluorescente *Sypro Ruby* (Lonza, Suiza) que se dejó durante toda la noche en agitación.

Al día siguiente se lavó la tinción de *Sypro Ruby* eliminando el exceso no unido a las proteínas con la solución de fijación manteniéndose el gel en agitación durante una hora. Tras esto, se sustituyó la solución por H₂O ultrapura y se escaneó el gel con una resolución de 16 bits y 200 μm a una longitud de onda de 488 nm mediante un escáner *Typhoon Scanner 9410* (GE, Suecia) (figura 37B).



Figura 37: Distintos aparatos para la adquisición de imágenes según el tipo de tinción de los geles. *Molecular Imager® VersaDoc™ MP 4000 System*(A); *Typhoon Scanner 9410* (B).

3.1.4 Almacenaje de geles

Una vez teñido y fotografiado (o escaneado), el gel se almacenó en una bolsa de plástico transparente con Tris 0.375M pH 8.8, SDS 0.1% y azida sódica 0.01%. La bolsa se selló al vacío y se guardó a 4°C.

3.2 Inmunodetección en geles 2D

Esta técnica es una variante de la inmunodetección clásica, en la cual los geles que se transfieren a la membrana de nitrocelulosa proceden de una electroforesis 2-DE. El protocolo seguido tras terminar la electroforesis es similar al descrito en el apartado anterior de inmunodetección. El resultado obtenido corresponde a la imagen de la proteína tras ser separada por su punto isoeléctrico y su peso molecular, permitiendo observar posibles fosforilaciones y glucosilaciones de dicha proteína, a la vez que se consigue una mejor resolución (figura 38).

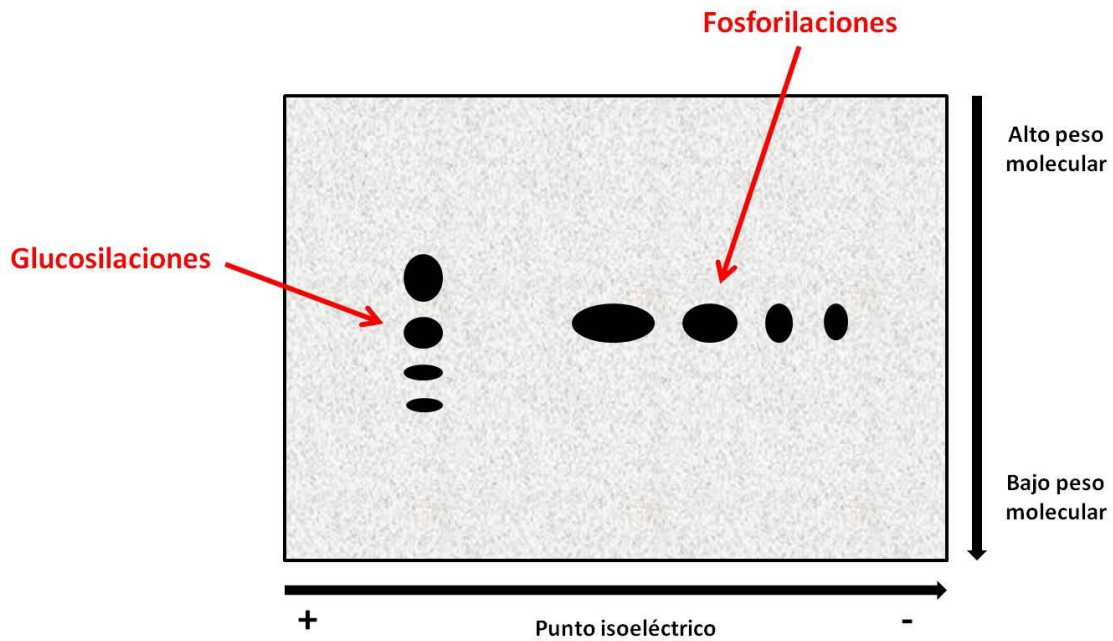


Figura 38: Dibujo esquemático mostrando la distribución de las fosforilaciones y glucosilaciones de una proteína en un gel 2D.

3.3 Análisis de imagen diferencial

El análisis diferencial de geles 2-DE es una poderosa herramienta utilizada para identificar diferencias cualitativas y cuantitativas de una proteína entre varios grupos experimentales distintos. Tras la tinción de un gel de electroforesis 2-DE se observa un patrón de manchas más o menos complejo, en el cual en teoría, cada mancha correspondería a una proteína de la muestra analizada.

Para el análisis de este trabajo se compararon las imágenes de varios grupos de 4 geles 2-DE cada uno (cada gel correspondiente a una muestra concreta y cada muestra correspondiente a un solo animal) (figura 39). Para llevar a cabo la comparación, las condiciones para la obtención de las imágenes tuvieron que ser las mismas (geles, IEF y electroforesis realizadas a la vez), intentando obtener patrones de manchas lo más homogéneos posibles dentro de cada grupo experimental. La homogeneidad de los mismos se observó mediante la realización de un análisis de los componentes principales (PCA).

Según el estudio realizado, se utilizaron dos tipos de análisis de imagen:

- El estudio del secretoma de tejido adiposo se llevó a cabo utilizando el software de análisis de imagen Ludesi REDFIN BASIC (Ludesi, Suecia, <http://www.ludesi.com>). Este análisis permitió un control óptimo sobre las potenciales variaciones derivadas de la técnica. Para la detección de las manchas, segmentación y colocalización en los geles se siguió un protocolo estricto que

aseguró un alto nivel de exactitud. Se midieron las intensidades de cada una de las manchas, normalizadas con la intensidad de fondo de los geles. Esta normalización permite eliminar diferencias sistemáticas en los geles como son variaciones de la intensidad en la tinción, tiempo de escaneado y carga proteica; permitiendo una cuantificación y comparación adecuada de los diferentes geles. Para las manchas que presentaban un incremento de cambio >2 y una varianza $p < 0.05$ (test estadístico ANOVA) se consideró que presentaban diferencias significativas, mientras que aquellas con una $p < 0.001$ se consideraron muy significativas y fueron seleccionadas para su escisión e identificación.

- Para el estudio del secretoma de tejido muscular esquelético, las imágenes se enviaron al Centro de Análisis de Ludesi (Lund, Suecia, <http://www.ludesi.com>) en donde se realizó un análisis profesional mediante el software Ludesi REDFIN Solo. Gracias a este software y al asesoramiento profesional del equipo de Ludesi, permitió un control más intensivo de las diferentes variaciones en los geles logrando un análisis robusto de las diferencias existentes entre los geles. Las manchas con un incremento de cambio >2 y una varianza $p < 0.05$ (test estadístico ANOVA) del análisis diferencial de sóleo frente a gastrocnemio, y un incremento de cambio >2 y una varianza $p < 0.01$ del análisis comparativo bajo condiciones *ad libitum* frente a ejercicio, fueron seleccionadas para su escisión e identificación.

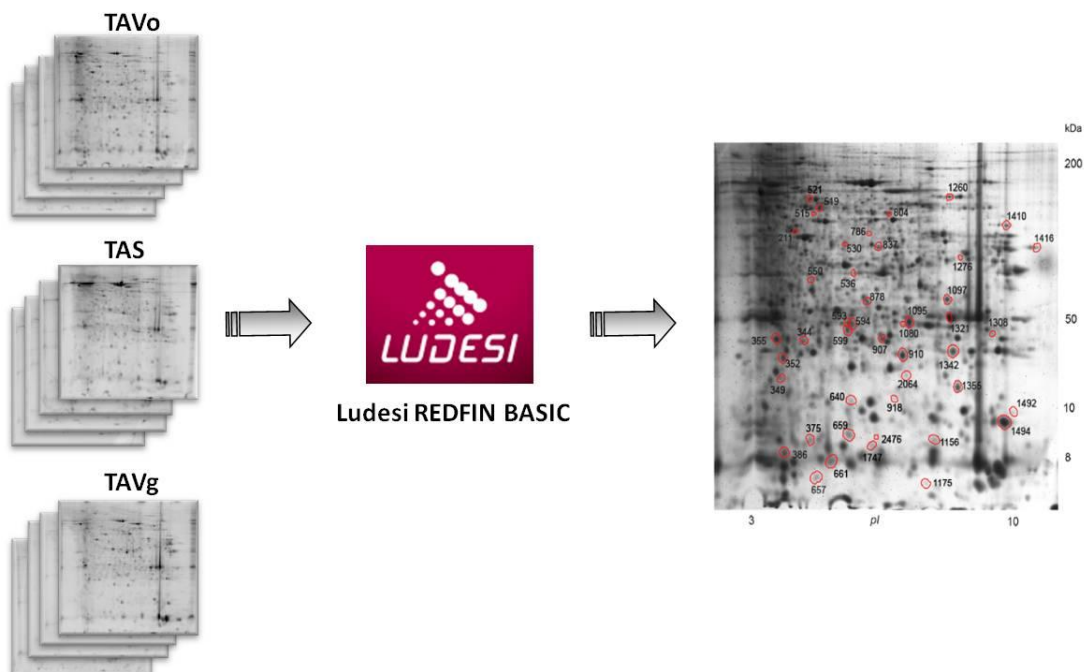


Figura 39: Esquema del proceso de análisis de imagen para el estudio comparativo del secretoma de los tres depósitos principales de TA en rata. A la derecha, distribución en el gel de las manchas que presentaban diferencias significativas.

3.4 Digestión proteica en gel

Una vez finalizado el análisis diferencial, las manchas seleccionadas se cortaron del gel. Esto se hizo de forma manual utilizando la mitad de una punta de pipeta de 200 μl para poder obtener con mayor precisión la sección del gel en donde se encuentra la mancha. En el caso de geles teñidos con azul de coomassie, las manchas se pudieron cortar a simple vista; sin embargo para los geles teñidos en *Sypro Ruby*, fue necesaria la utilización de un transiluminador *Dark Reader DR46B Transilluminator* (Clare Chemical Research, CO, EUA) en oscuridad (figura 40A). Los trozos de gel se pasaron a tubos eppendorf individuales con unos 10 μl de H_2O ultrapura.

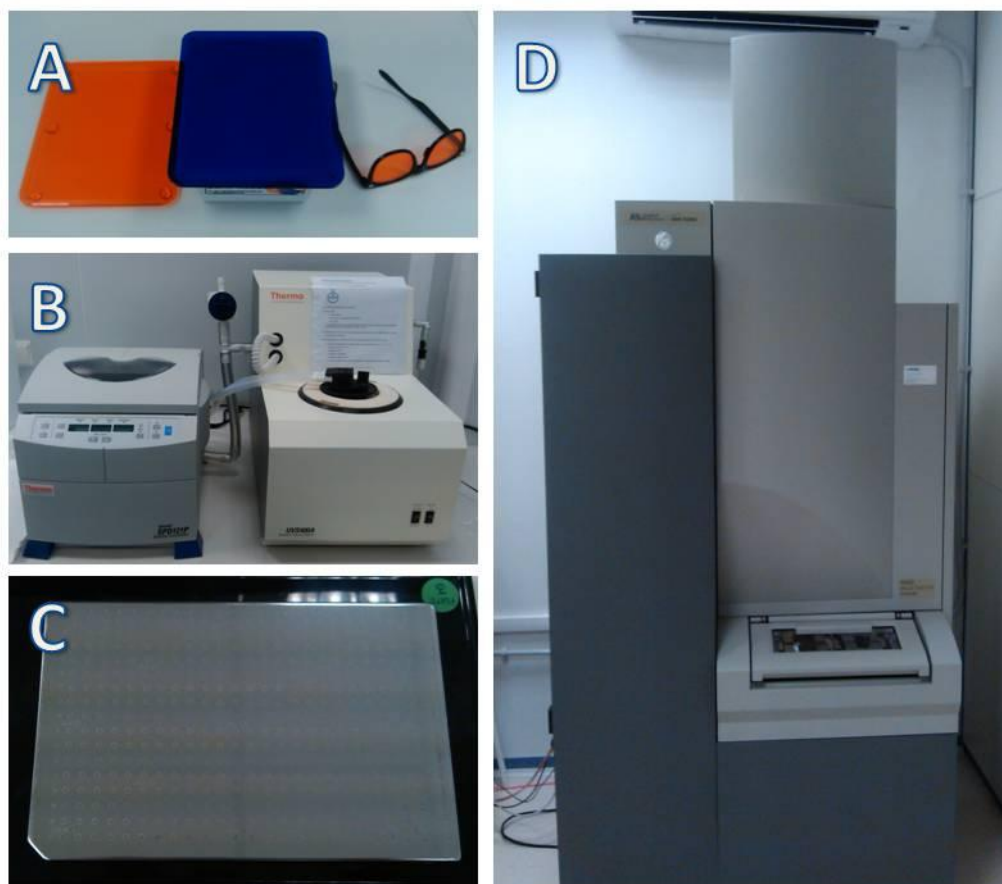


Figura 40: Principales equipos utilizados para la escisión, digestión e identificación de las manchas seleccionadas en un gel 2-DE. *Dark Reader DR46B Transilluminator* (A); *Savant SpeedVac Concentrator* (B); *Opti-TOF MALDI plate* (C); *4800 MALDI-TOF/TOF Analyze* (D).

Antes de poder realizarse la identificación mediante el espectrómetro de masas fue necesario hacer una serie de modificaciones y realizar una digestión peptídica de las proteínas dentro del mismo gel. Dichas modificaciones son la reducción de puentes disulfuro y la alquilación de las cisteínas, de esta forma las proteínas quedan desnaturalizadas mostrando los sitios de corte para la digestión enzimática y también evitando la formación de dímeros. El protocolo utilizado fue el siguiente (figura 41):

- Se realizaron 3 lavados de 30 minutos cada uno con 190 μ l de una solución de bicarbonato amónico 50 mM (Sigma-Aldrich, MO, EUA) y metanol 50% de grado HPLC (Scharlau, España) (solución de lavado) si la tinción fue realizada con azul de Coomassie. En el caso de las muestras teñidas con Sypro Ruby, cada uno de los tiempos de lavado fueron de 20 minutos. Posteriormente se dejaron 5 minutos en 50 μ l de acetonitrilo 100% de grado HPLC (Scharlau, España) para deshidratar los geles y se secaron mediante una centrifuga de evaporación al vacío (*Savant SpeedVac Concentrator*, Thermo Scientific, MA, EUA) (figura 40B).
- Se redujeron los posibles puentes disulfuro de la muestra mediante una incubación de 30 minutos a 56°C con 50 μ l de ditioneitol 10 mM (Sigma-Aldrich, MO, EUA) en bicarbonato amónico 50 mM. Tras esto se realizaron 2 lavados de 10 minutos cada uno con 190 μ l de la solución de lavado, para luego volver a incubar la muestra 5 minutos con 50 μ l de acetonitrilo 100% y se deshidrató la muestra.
- Una vez deshidratada, la muestra se incubó 20 minutos en oscuridad con 40 μ l de yodoacetamida 55 mM (Sigma-Aldrich, MO, EUA) en bicarbonato amónico 50 mM para producir la alquilación de las cisteínas. Posteriormente se repitieron los pasos de lavado y deshidratación comentados arriba.
- Se añadió tripsina porcina 20 ng/ μ l (Promega, WI, EUA) en bicarbonato amónico 20 mM y se incubó a 37°C durante toda la noche.
- Tras la digestión, se extrajeron los péptidos resultantes con una solución de acetonitrilo 60% y ácido fórmico 0.5% (Scharlau, España). Este paso se realizó 3 veces para obtener la mayor cantidad posible de péptidos (35-40-35 μ l). Entre cada extracción se incubaron las muestras 20 minutos con la solución.
- Finalmente se unieron las tres extracciones peptídicas, se concentraron al vacío y se guardaron a -20°C hasta su uso.

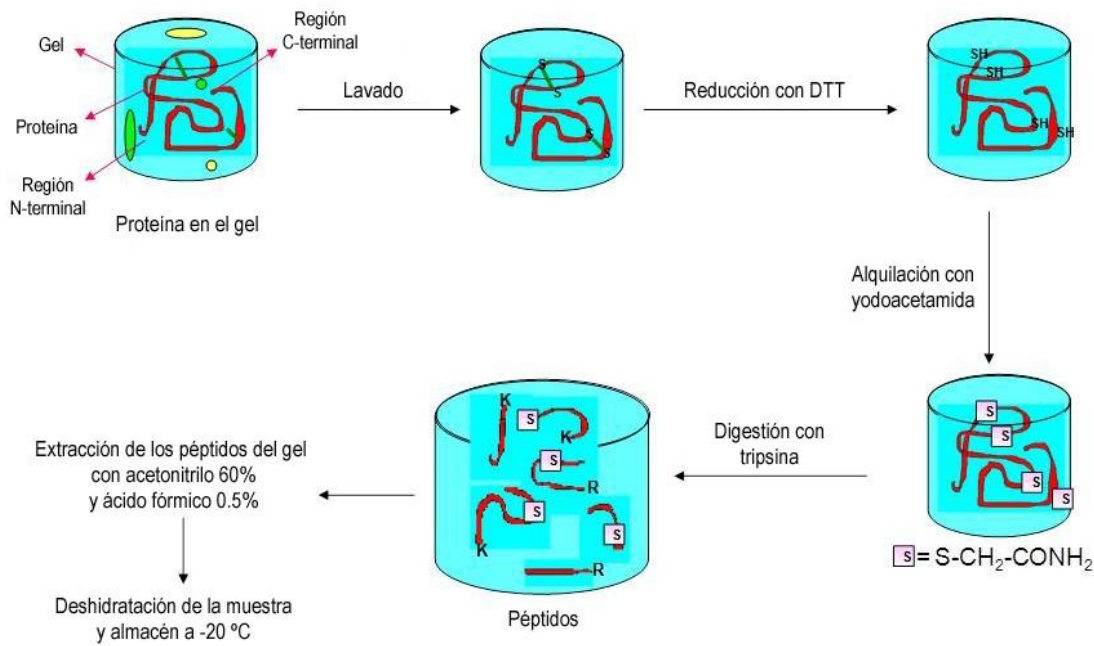


Figura 41: Protocolo esquemático de los pasos necesarios para realizar la digestión enzimática de las proteínas dentro de un gel de electroforesis.

3.5 Espectrometría de masas

Para la identificación por espectrometría de masas, las muestras se resuspendieron en ácido fórmico 0.5%, tras esto se cargaron 0.5 μ l de muestra junto con 0.5 μ l de matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (3 mg diluidos en 1 ml de acetonitrilo 50% y ácido trifluoroacético 0.1%) en un plato de 384 espacios *Opti-TOF MALDI plate* (Applied Biosystems, CA, EUA) (figura 40C), y se dejó secar la mezcla a temperatura ambiente.

Los datos de espectrometría de masas fueron obtenidos automáticamente utilizando un *4800 MALDI-TOF/TOF Analyzer* (Applied Biosystems, CA, EUA) con fuente de ionización MALDI (desorción/ionización láser asistido por matriz) (figura 40D). Los espectros de masas (MS) se adquirieron en modo reflector positivo con un láser Nd:YAG (*neodymium-doped yttrium aluminium garnet*) de 355 nm. La media de disparos del láser por muestra fue de 1000 y se utilizaron al menos tres picos resultantes de la autólisis de la tripsina como calibración interna. Todos los espectros de fragmentación MS/MS fueron realizados tras seleccionar los precursores con una resolución 300 FWHM ("Full Width High at Half Maximum") y la supresión de metaestables.

El análisis automático de los datos obtenidos se realizó mediante el software *4000 Series Explorer Software v3.5* (Applied Biosystems, CA, EUA). Los datos de los espectros de MS y MS/MS se combinaron a través del *GPS Explorer Software v3.6* mediante el

Mascot Software v2.1 (Matrix Science) para realizar la búsqueda en una base de datos no-redundante (SwissProt release 56.0), con una tolerancia de 30 ppm para la masa del péptido y 0.35 Da de tolerancia para los fragmentos peptídicos resultantes. Todos los espectros y datos obtenidos fueron revisados manualmente en detalle usando los softwares previamente citados. Los valores de detección obtenidos por identificación superiores a 56 fueron aceptados como significativos ($p < 0.05$), considerando positiva la identificación cuando el coeficiente de intervalo se encontraba por encima del 98%. En el caso de los espectros MS/MS, el porcentaje de confianza aceptado se dispuso por encima del 95%.

3.6 Predicción de proteínas secretadas

Las proteínas identificadas se analizaron a través del servidor SecretomeP 2.0 (Centre for Biological Sequence Analysis: <http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>), un método de predicción basado en la secuencia capaz de identificar proteínas secretadas de mamíferos tanto para las rutas clásicas como no clásicas de secreción [139, 186].

Por cada secuencia aminoacídica introducida de la proteína (en formato FASTA), el servidor predice la posibilidad de que la proteína siga la ruta de secreción no clásica, otorgando los valores más altos (hasta un máximo de 1.00) a las proteínas que entran dentro de las rutas de secreción clásica (aquellas proteínas con péptido señal). Se consideraría que la proteína sigue una ruta de secreción no clásica cuando los valores obtenidos superen el límite normal de 0.50.

3.7 Análisis de la interacción entre proteínas

Se usó el *Ingenuity Pathways Analysis Software IPA 8.0* (Ingenuity Systems, CA, EUA) para examinar posibles interacciones entre todas las proteínas identificadas en los distintos secretomas estudiados por proteómica.

Las rutas interactivas fueron generadas para representar las relaciones potenciales tanto directas como indirectas entre las proteínas secretadas. Los valores de probabilidad proporcionados por el software surgen a partir de un valor $p < 0.05$. Sólo se escogieron las redes con al menos un 10% de participación entre todas las proteínas identificadas.

IV. Resultados

1. Establecimiento y caracterización de modelos animales en diferentes situaciones fisiológicas y patológicas.

1.1 Restricción calórica, ejercicio y anorexia basada en la actividad (ABA)

El aporte nutricional y la actividad física son los factores más relevantes en el mantenimiento de la homeostasis energética interna. Los tejidos implicados en este proceso responden rápidamente a los estímulos inducidos por estos factores, por lo que consecuentemente se produce una variación en la señalización endocrina que puede ser medida y aprovechada en investigación para la identificación y/o la caracterización de nuevas señales implicadas en esta regulación. El modelo de anorexia basada en la actividad (ABA) [175] es un modelo animal prometedor, poco usado en estudios endocrinológicos, que combina la acción del ejercicio junto con la restricción calórica, por lo que podría ser muy útil para estudios de señalización endocrina. Se realizó una caracterización de este modelo para evaluar su eficacia como modelo endocrinológico y su uso en estudios posteriores.

1.1.1 Parámetros fisiológicos

Como muestra la figura 42, los grupos con alimentación *ad libitum* y ejercicio mostraron un aumento progresivo en su peso corporal, a lo largo de los 6 días de duración del experimento, sin haber diferencias significativas entre ellos. Por el contrario, el acceso limitado a comida durante una hora al día sumado al libre acceso a la rueda de ejercicio produjo en el grupo ABA una marcada disminución del peso corporal, que fue evidente desde el día 1 al 6.

Se fijó el límite de 6 días para el experimento de ABA por motivos éticos, puesto que a partir del sexto día las ratas alcanzaban pérdidas de su masa corporal superiores al 25-30 % y empezaban a aparecer síntomas de desnutrición severa, como úlceras en el estómago y pérdida en el control de la temperatura corporal. Debido a estas condiciones extremas, también a partir del sexto día, se observó una significativa reducción de su actividad física como se muestra en la figura 42C.

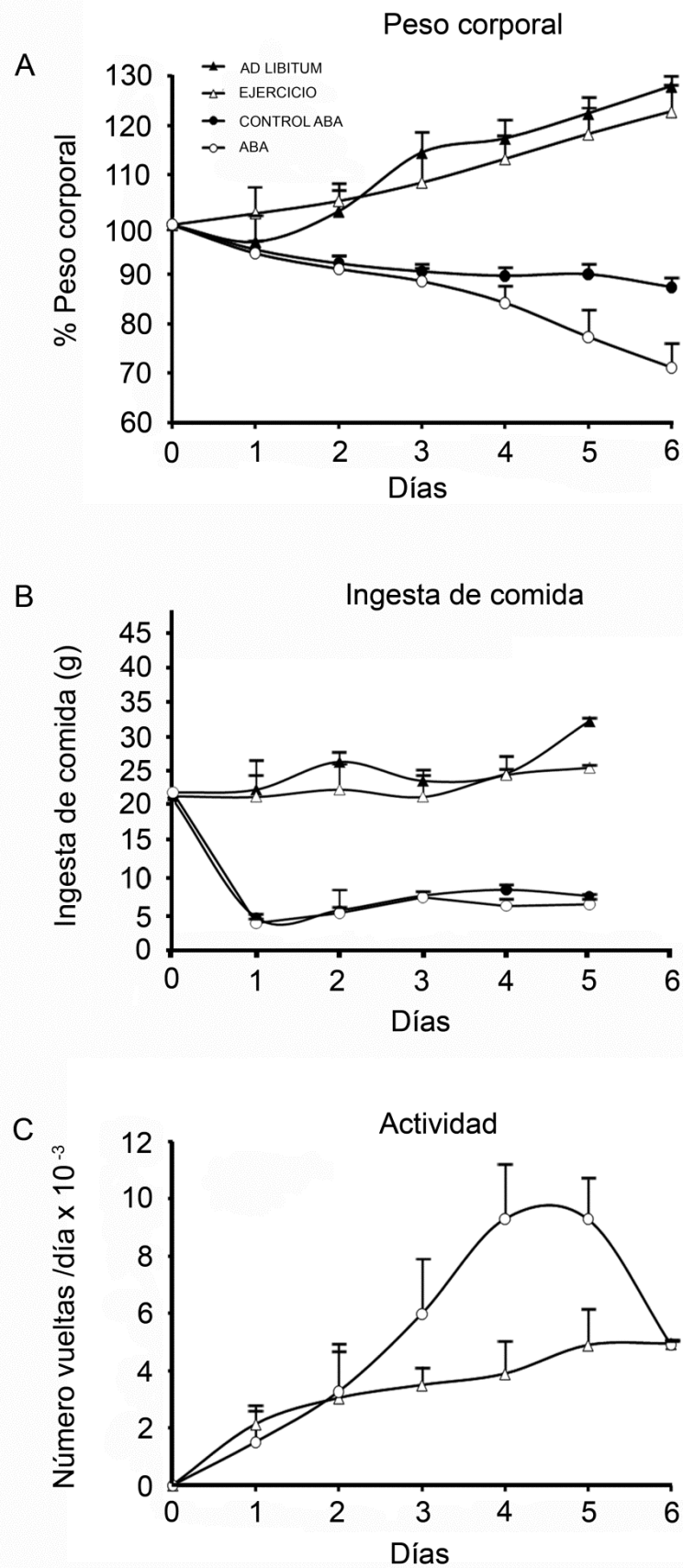


Figura 42: Variación de los parámetros fisiológicos en los modelos animales establecidos: A. Variación de peso corporal (%); B. Ingesta diaria (g); C. Número de vueltas diarias.

Fue interesante comprobar cómo el grupo control de ABA mostraba también una significativa disminución de su peso corporal, pero al contrario que ocurría en ABA, esta se estabilizaba cuando los animales alcanzaban pérdidas de masa corporal de alrededor del 10 % (figura 42A). Como se muestra en la figura 42B, no hubo una variación significativa en el consumo diario de alimentos entre los grupos de ejercicio y *ad libitum*; de la misma manera, los grupos ABA y control ABA tampoco presentaron diferencias significativas en el consumo de alimentos, a pesar del aumento de la actividad física del grupo ABA. Al observar la actividad, se contabilizó un número significativamente menor de vueltas con respecto al grupo ABA a partir del día 3 del experimento (figura 42C).

Para evaluar los cambios en la composición corporal durante el transcurso del experimento, se utilizó un sistema de imagen por resonancia magnética para todos los grupos experimentales tal y como se describe en los métodos. Como se muestra en la figura 43, el tejido magro (masa muscular) a los 6 días de experimento aumentó en todos los grupos, sin embargo, el tejido adiposo disminuyó considerablemente en el grupo control ABA, siendo más drástica esta disminución en el grupo ABA; mientras que no se encontraron variaciones significativas en los grupos de ejercicio y *ad libitum*. Es interesante destacar que si bien las ratas de grupo ABA presentaba una reducción en todos sus depósitos de tejido adiposo corporales, en el caso del tejido adiposo gonadal (TAVg) la disminución fue dramática, llegando incluso a desaparecer por completo en algunas ratas al finalizar el experimento, lo que complicó en buena medida los análisis posteriores.

1.1.2 Parámetros hormonales y metabólicos

Los niveles en sangre periférica de la hormona orexigénica ghrelina y de la anorexigénica leptina se utilizaron como marcadores del estado nutricional en todos los modelos.

Los niveles de leptina en suero disminuyeron significativamente en el grupo control ABA y muy significativamente en el grupo ABA, mostrando una correlación directa con la cantidad de tejido adiposo corporal, y una relación inversa con los niveles de ghrelina en suero (figuras 44A y 44B).

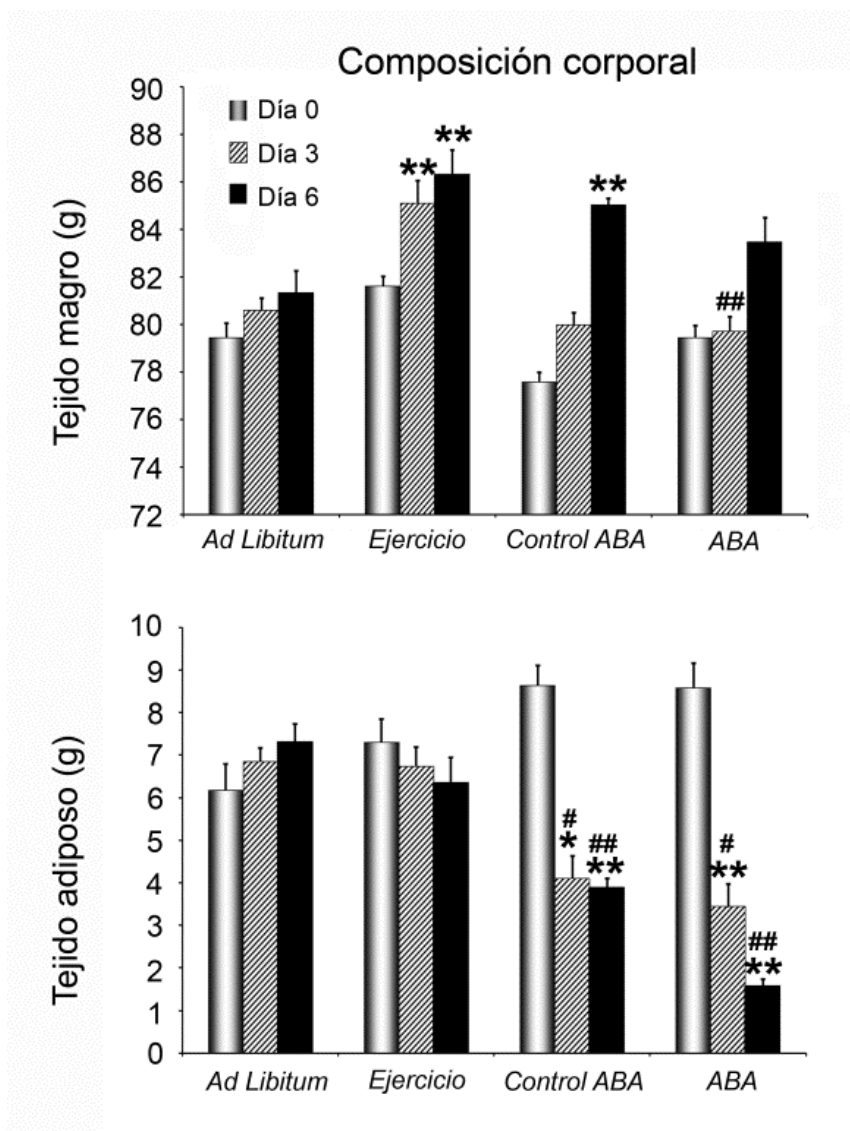


Figura 43: Variación de la composición corporal de los distintos modelos animales establecidos: El análisis del tejido magro y adiposo fue realizado mediante imagen de resonancia magnética en los modelos animales tras 0, 3 y 6 días (n=15 por grupo). Se representó la cantidad de tejido magro y adiposo (g) en relación con el peso corporal total. Las diferencias significativas se indican como *p<0.05, **p<0.01 frente a *ad libitum*; y #p<0.05, ##p<0.01 frente a ejercicio.

De forma complementaria, se utilizó el modelo de evaluación de la homeostasis (índice HOMA) para estimar la sensibilidad a la insulina en los cuatro grupos animales. Como se muestra en la figura 44C, tanto el ejercicio como la restricción de comida de manera individual (representados por los modelos de ejercicio y control ABA respectivamente) aumentaron significativamente la sensibilidad a la insulina, siendo esta incluso mayor cuando se combinaron ambos factores (grupo ABA).

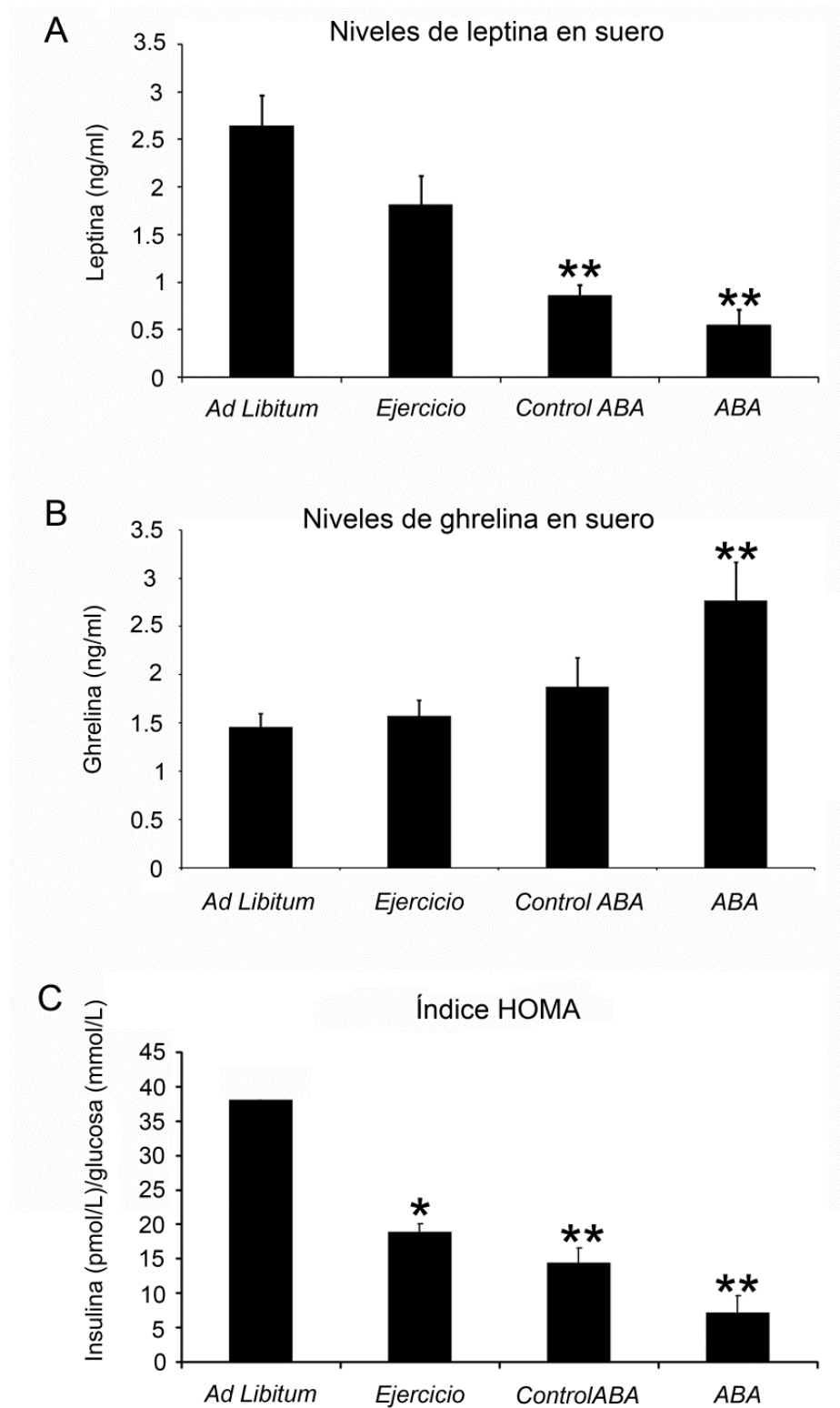


Figura 44: Parámetros hormonales en los modelos animales establecidos. A. Niveles circulantes de leptina; B. Niveles circulantes de ghrelina; C. Índice HOMA. Las diferencias significativas se indican como * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ frente a *ad libitum*.

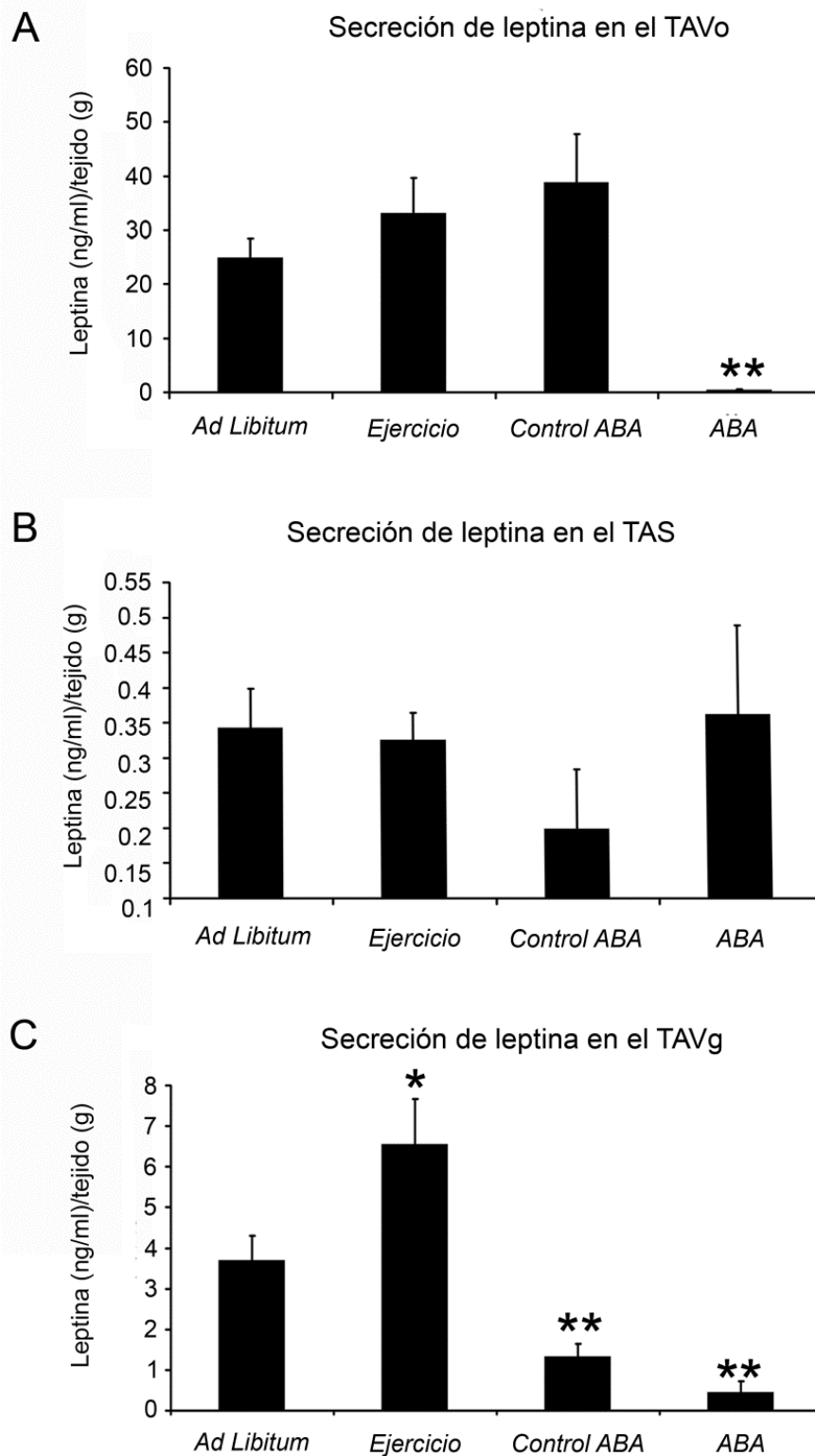


Figura 45: Niveles de secreción de leptina medidos *in vitro* en explantes de tejido adiposo. A. TAVo; B. TAS; C. TAVg. Las diferencias significativas se indican como * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ frente a *ad libitum*.

Para averiguar si la reducción en los niveles periféricos de leptina estaban causados por la reducción de tejido adiposo corporal o por el contrario por una disminución en la secreción de leptina por parte de los adipocitos, se midió la secreción *in vitro* de leptina en diferentes depósitos de tejido adiposo. Sorprendentemente, se encontró una gran variación entre los diferentes depósitos ya en condiciones *ad libitum*, con valores que iban desde los 0.35 ng/ml en TAS a los 25 ng/ml en TAVo (figura 45).

Cuando se estudiaron los diferentes grupos animales, se encontraron diferencias significativas en la secreción directa de leptina por parte del TAVg y el TAVo. La secreción en el TAVo se incrementó en el grupo de ejercicio, mientras que disminuyó significativamente en los grupos ABA y control ABA; por otra parte, el TAVo sólo mostró una disminución significativa de la secreción en las ratas del grupo ABA (figura 45A). Fue interesante comprobar cómo no se encontraron diferencias significativas en los niveles de leptina liberados por los explantes de TAS en las mismas condiciones experimentales.

1.1.3 Expresión de los receptores de leptina y ghrelina en tejidos periféricos.

Para estimar la sensibilidad a los niveles circulantes de leptina y ghrelina de los tejidos adiposo y muscular, se hizo un estudio por inmunodetección de los receptores de leptina (LEPR) y ghrelina (GHS-R1a) en los cuatro grupos experimentales.

Los resultados de los inmunoblots mostraron que la expresión de GHS-R1a no se veía afectada por la restricción calórica o el ejercicio en los extractos del tejido muscular gastrocnemio, sin embargo, sí que se encontró variaciones en el sóleo (figura 46A). En este tejido, la restricción calórica y el ejercicio produjo un aumento en los niveles de este receptor, aunque este efecto no se observó en el grupo ABA.

El estudio de GHS-R1a en los diferentes depósitos de tejido adiposo mostró que la actividad física y el ayuno incrementaban la expresión de este receptor en el TAVo y el TAS; por otro lado, la combinación de ambos factores en el TAS (grupo ABA) resultó en una disminución de la expresión a niveles basales comparados con el grupo *ad libitum*. No se detectaron variaciones significativas en el TAVg de ninguno de los modelos (figura 46A).

En el caso de LEPR, se detectaron por inmunoblot, tanto en tejido adiposo como muscular, dos isoformas de aproximadamente 125 y 100 kDa correspondientes a las formas larga (forma activa) y corta (forma inactiva) que presenta este receptor.

De manera similar a los resultados con GHS-R1a, se identificaron diferencias en la expresión de LEPR asociadas al tipo de tejido muscular. La presencia de LEPR en el músculo gastrocnemio se incrementó significativamente en ejercicio, control ABA y

ABA, al compararlos con el grupo *ad libitum* (figura 46B). No obstante, la banda predominante de LEPR encontrada en los grupos de ejercicio y ABA pertenecían a la forma inactiva. Por el contrario, la expresión total de LEPR en sóleo disminuyó en condiciones de ejercicio y restricción calórica, incluyendo el grupo ABA, comparados con los animales del grupo *ad libitum*; esta disminución se encontró muy marcada en el caso del grupo de ejercicio (figura 46B). Al contrario de lo que ocurría en el músculo gastrocnemio, la forma predominante de LEPR en el sóleo del grupo ABA fue la activa.

El estudio del receptor de leptina en los diferentes depósitos de tejido adiposo mostró una marcada variación dependiendo de la localización anatómica. El TAVo y el TAVg de los grupos de ejercicio y restricción de comida, incluido el grupo ABA, expresaron exclusivamente la forma corta de LEPR, mientras que el TAS mostró las dos formas, produciéndose una sobreexpresión de ambas en el grupo ABA, mientras que su expresión se veía disminuida en condiciones de ejercicio.

En general los tejidos sóleo, TAS y TAVo parecen los más sensibles a ghrelina, destacando su mayor participación en la regulación metabólica del organismo en comparación de los tejidos gastrocnemio y TAVg. En el caso de la leptina, al comprobar la expresión de la forma activa de su receptor, de entre todos los tejidos analizados, los tejidos sóleo y TAS se definieron como los más sensibles a esta hormona y por tanto los que ofrecerían una respuesta más rápida a los cambios inducidos por la leptina.

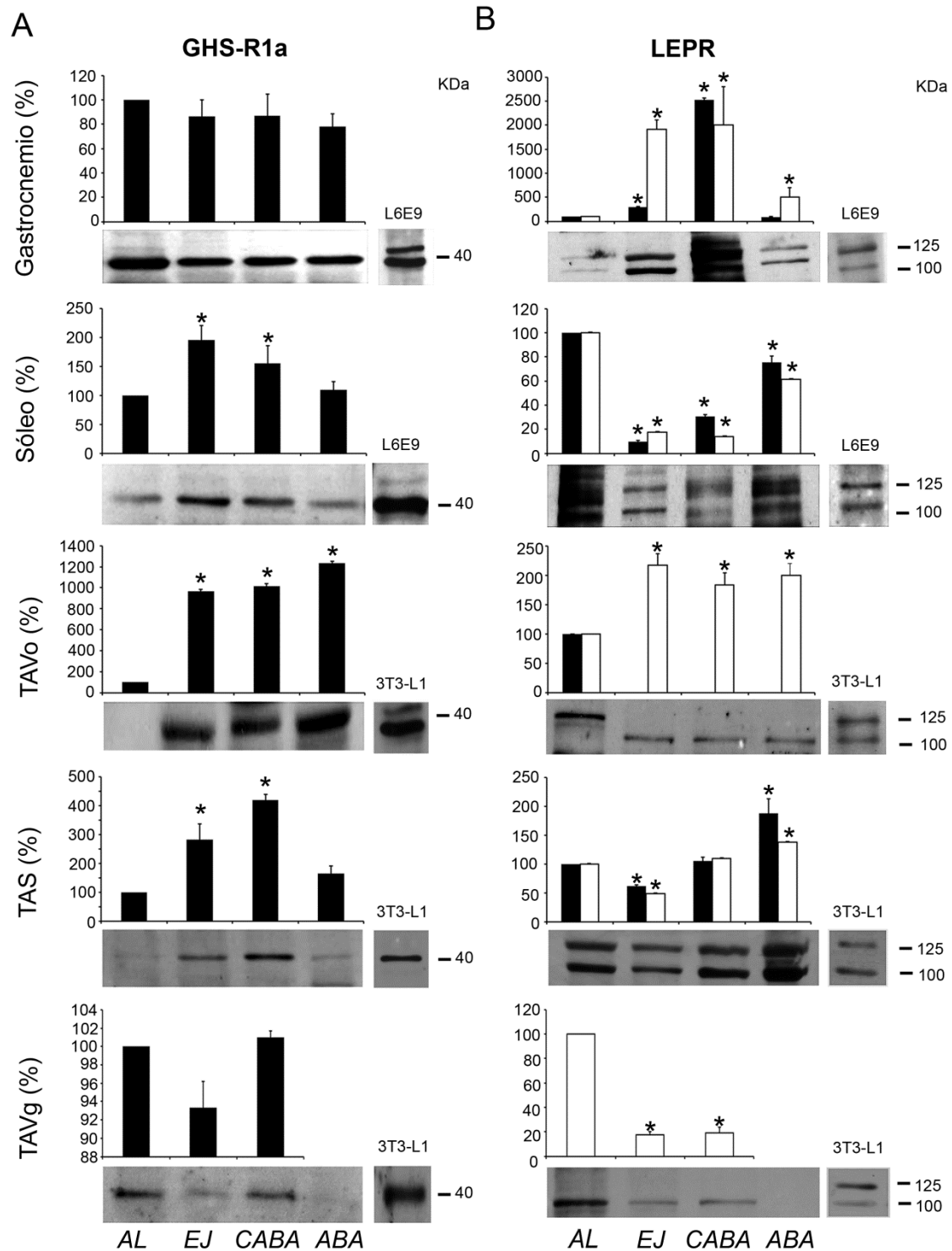


Figura 46: Expresión de los receptores de ghrelina (GHS-R1a) y leptina (LEPR) en tejidos periféricos. A. Expresión de GHS-R1a; B. Expresión de LEPR. Las líneas celulares 3T3-L1 y L6E9 diferenciadas fueron utilizadas como controles positivos. La densitometría de las bandas se muestra como porcentaje frente a los animales *ad libitum*. La expresión de la forma larga y corta de LEPR se representa en los histogramas con los colores negro y blanco respectivamente. Las diferencias significativas se indican como * $p < 0.05$ frente a *ad libitum*. El TAVg del grupo ABA extraído fue insuficiente para la realización del análisis por inmunodetección.

1.2 Obesidad inducida por la dieta (DIO)

El modelo de obesidad inducida por la dieta es uno de los modelos animales más conocidos y mejor caracterizados para la realización de estudios endocrinológicos, en concreto para los estudios de los efectos de la obesidad y de la acumulación excesiva de tejido adiposo. Debido a este conocimiento, para el establecimiento de este modelo y su posterior uso en subsiguientes estudios, se realizó una caracterización equivalente, aunque menos intensiva, a la realizada para los modelos de restricción calórica, ejercicio y ABA.

1.2.1 Parámetros fisiológicos

Durante las 10 semanas que duró el experimento, se fue monitorizando el incremento de peso producido por la diferente dieta aportada a los animales. Como se muestra en la figura 47A, ya desde la primera semana las ratas del grupo DIO presentaban un peso significativamente mayor que el grupo control, diferencias que se fue incrementando a medida que avanzaba el modelo. Resulta destacable comprobar cómo al medir la ingesta media de los animales, no se encontraron diferencias significativas a lo largo del experimento dentro del mismo grupo, sin embargo al comparar ambos grupos, se observó que el grupo DIO consumía una menor cantidad de alimento, demostrando que la dieta hipercalórica produce una mayor sensación de saciedad en los animales (figura 47B).

Los datos de composición corporal aportados por la técnica de imagen por resonancia magnética, mostraron como se iban incrementando los porcentajes tanto de masa grasa (figura 47C) como de masa libre de grasa o masa magra (figura 47D) con diferencias significativas entre grupos a partir de la primera semana. El incremento más notable se produjo con respecto al porcentaje de masa grasa.

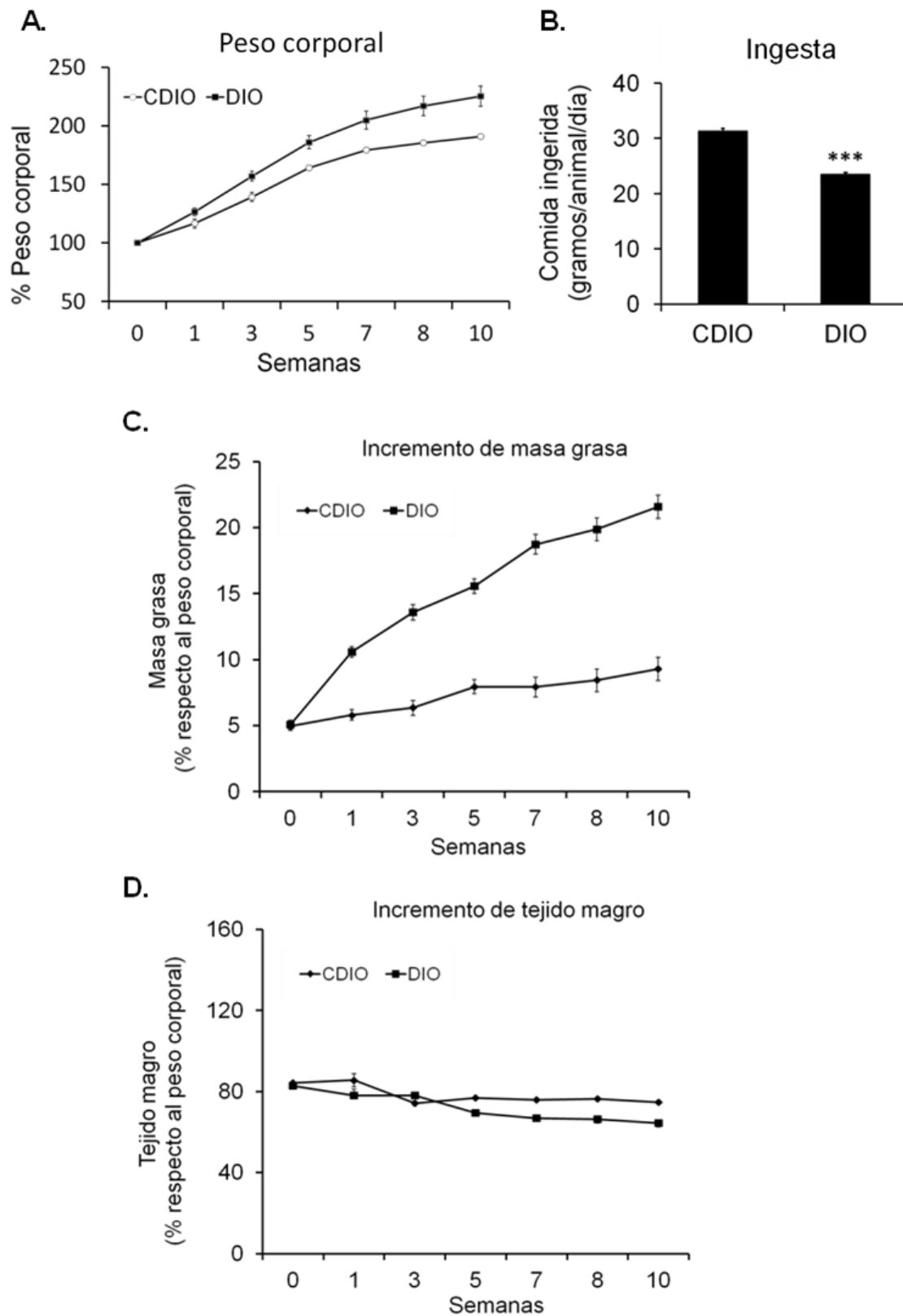


Figura 47: Variación de parámetros fisiológicos durante el desarrollo del experimento DIO. A. Variación de peso corporal (%); B. Ingesta diaria de comida (g/animal/día); C. Variación de masa grasa (%); D. Variación de masa magra (%). Las diferencias significativas se indican como *** $p < 0.001$ frente a CDIO.

Se realizó el test oral de intolerancia a la glucosa la semana previa a finalizar el experimento (semana 9). Tras la administración de glucosa oral exógena a los animales se midieron los niveles de glucosa en el tiempo, observándose que los animales del grupo control presentaban una distribución normalizada; sin embargo en las ratas con dieta hipercalórica, los niveles se mantuvieron elevados a lo largo de la prueba, sugiriendo la existencia de una intolerancia a la glucosa o incluso resistencia a la insulina (figura 48).

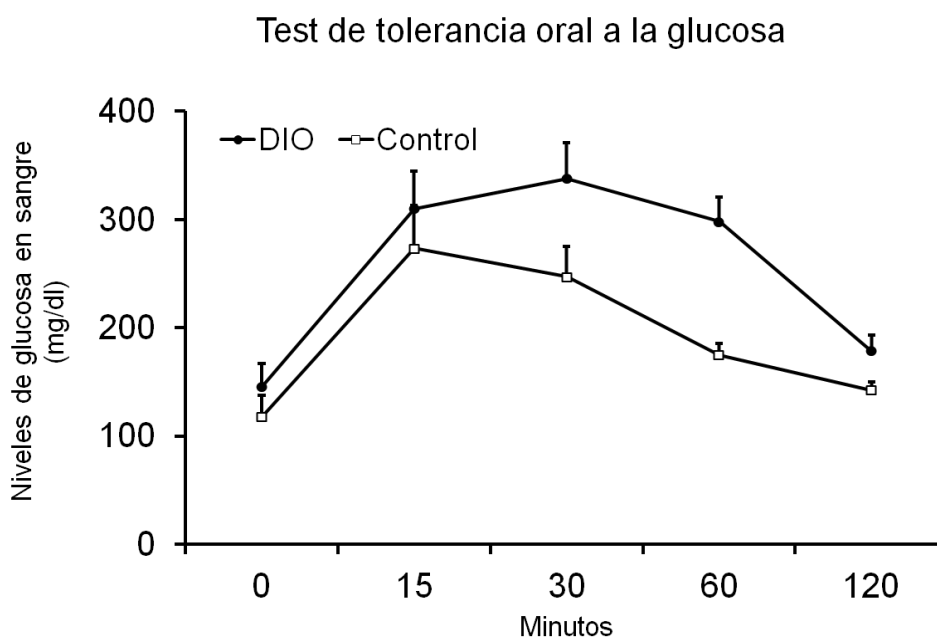


Figura 48: Test de tolerancia a la glucosa en el experimento DIO.

1.2.2 Parámetros hormonales y metabólicos

Al igual que en los modelos descritos antes, se utilizaron los valores de las hormonas leptina y ghrelina, tras las 10 semanas de duración del experimento, como marcadores del estado nutricional.

Como era de esperar, el grupo DIO presentó unos mayores niveles de leptina circulante, correlacionándose positivamente con la mayor cantidad de tejido graso respecto al grupo control (figura 49A). Para intentar determinar qué depósito de tejido adiposo participaba más activamente de la secreción de leptina, se midieron los niveles de leptina presentes en los secretomas de explantes de TAS, TAVo y TAVg; comprobando que el TAVo era con diferencia el mayor responsable en la secreción de leptina (figura 49B), y el único que presentaba diferencias entre los grupos siguiendo una distribución similar a los niveles observados en suero. El aporte en ng/ml de leptina por parte del TAS y TAVg tanto en obesidad como su control fue similar al

observado en el modelo ABA caracterizado previamente, sin embargo en el TAVo de los animales del modelo DIO se observaron los valores más elevados.

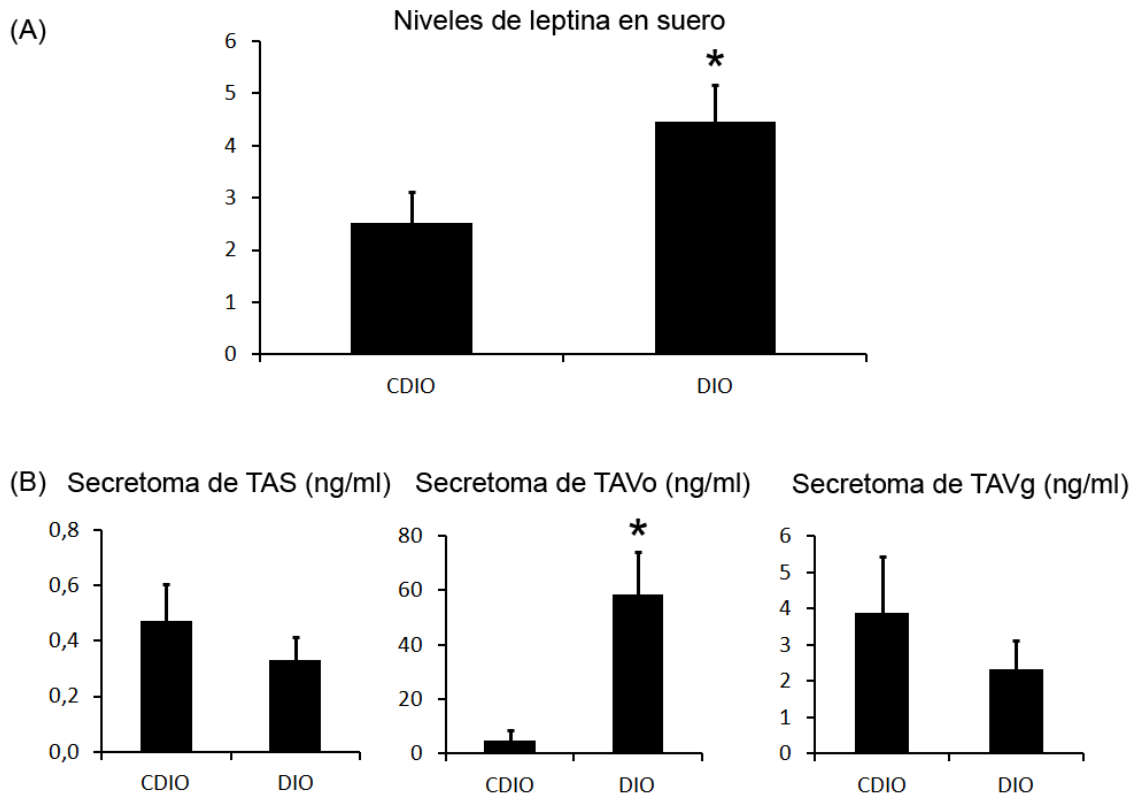


Figura 49: Niveles de leptina circulante y en secretomas de tejido adiposo. A. Niveles de leptina en suero; B. Niveles de secreción de leptina a partir de los depósitos de TAS, TAVo y TAVg. Las diferencias significativas se indican como * $p < 0.05$ frente a CDIO.

En el caso de la ghrelina, de forma sorprendente se comprobó que los niveles en DIO se encontraban significativamente más elevados que en sus controles (figura 50).

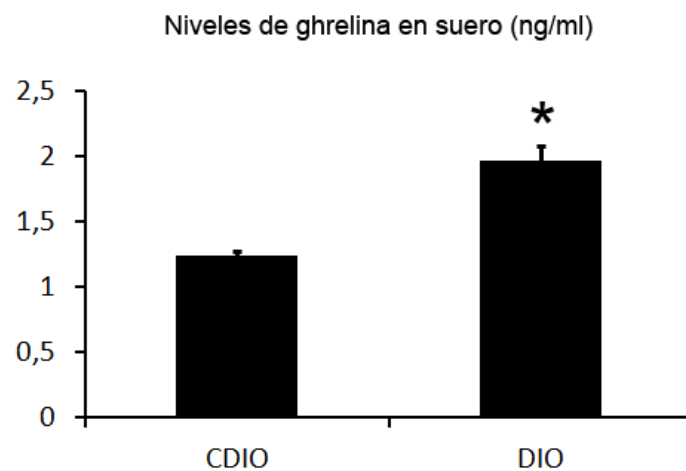


Figura 50: Niveles de ghrelina circulantes en el modelo DIO. Las diferencias significativas se indican como * $p < 0.05$ frente a CDIO.

2. Caracterización del secretoma del tejido adiposo blanco en función de su localización anatómica.

A lo largo de la bibliografía se pueden encontrar diferentes estudios proteómicos realizados sobre la secreción del tejido adiposo, sin embargo dichos estudios se basaron mayoritariamente en describir los patrones de secreción de la fracción celular; muy pocos se han basado en la secreción directa de explantes de tejido adiposo y menos aún en cuantificar las diferencias entre los distintos depósitos existentes. Bajo este contexto se consideró de gran importancia la caracterización del perfil de secreción de los depósitos de tejido adiposo más relevantes en rata, Así mismo, se propuso realizar un estudio diferencial entre estos depósitos mediante técnicas proteómicas; todo ello en muestras bajo condiciones *ad libitum*.

2.1 Establecimiento y validación de los secretomas a partir de explantes

La técnica de explantes de tejido adiposo para la obtención de su secretoma es una técnica que puede aportar una valiosa información sobre las proteínas que secreta este tejido, sin embargo no está exento de complicaciones que pueden alterar el resultado final apareciendo falsos positivos o la enmascaración de proteínas potencialmente interesantes en favor de otras más conocidas y menos relevantes. Por tanto fue necesario realizar un proceso de estandarización y validación de los secretomas antes de su uso en los diferentes estudios.

El primer aspecto que se valoró fue la elección de los diferentes depósitos de tejido adiposo que se iban a utilizar para la obtención de los secretomas. Se seleccionó el TAVo, situado entre las vísceras, por ser el tejido adiposo cuya acumulación causa la mayor parte de problemas derivados de la obesidad y su posición y funciones se asemejan en gran medida al TAVo humano. Como representante del TAS se optó por el situado en la zona glúteo-femoral, depósito pocas veces relacionado con las complicaciones de la obesidad [67]. Por último, se consideró oportuno utilizar el depósito de tejido adiposo unido físicamente a los testículos TAVg, relacionado directamente con la función sexual [83] pero que en multitud de estudios se ha utilizado indistintamente como depósito representativo del TAV por la facilidad de su extracción [77, 151].

Una vez seleccionados, los distintos depósitos se extrajeron minimizando al máximo tanto las contaminaciones externas como la rotura o daño celular. El proceso de obtención de los secretomas fue optimizado según se describe en el apartado de materiales y métodos, y se procedió a su validación mediante el estudio de la secreción de adipoquinas conocidas, seleccionando para ello la adiponectina y la leptina (figura 51). Se comprobó que ambas proteínas se encontraban presentes en los

tres depósitos observándose diferencias significativas en sus niveles de secreción al compararlos entre sí.

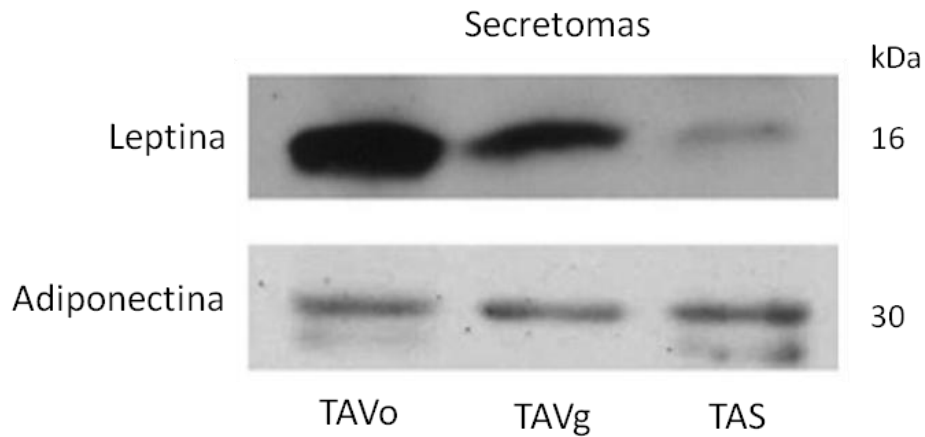


Figura 51: Imagen de la inmunodetección de leptina y adiponectina en los secretomas de explantes de TA usados en este estudio.

2.2 Mapas 2-DE de referencia de los secretomas de tejido adiposo visceral, subcutáneo y gonadal

Los secretomas de los depósitos de tejido adiposo procedentes de diferentes localizaciones anatómicas se recogieron tras 24 horas de incubación *in vitro* de los explantes y fueron procesados para su análisis por 2-DE como se describe en la sección de materiales y métodos.

Para la segunda dimensión, se hicieron geles del 10 y 15 % de acrilamida/bisacrilamida para separar las proteínas de alto y bajo peso molecular respectivamente, cortando las manchas más representativas para conformar los mapas de secreción (335 manchas en TAVo, 161 en TAS, y 113 en TAVg) (figuras 52, 53 y 54).

El análisis de espectrometría de masas de estas manchas, permitieron la identificación de 188, 85 y 91 proteínas diferentes en TAVo, TAS y TAVg respectivamente (apéndice, tablas suplementarias 1, 2, 3).

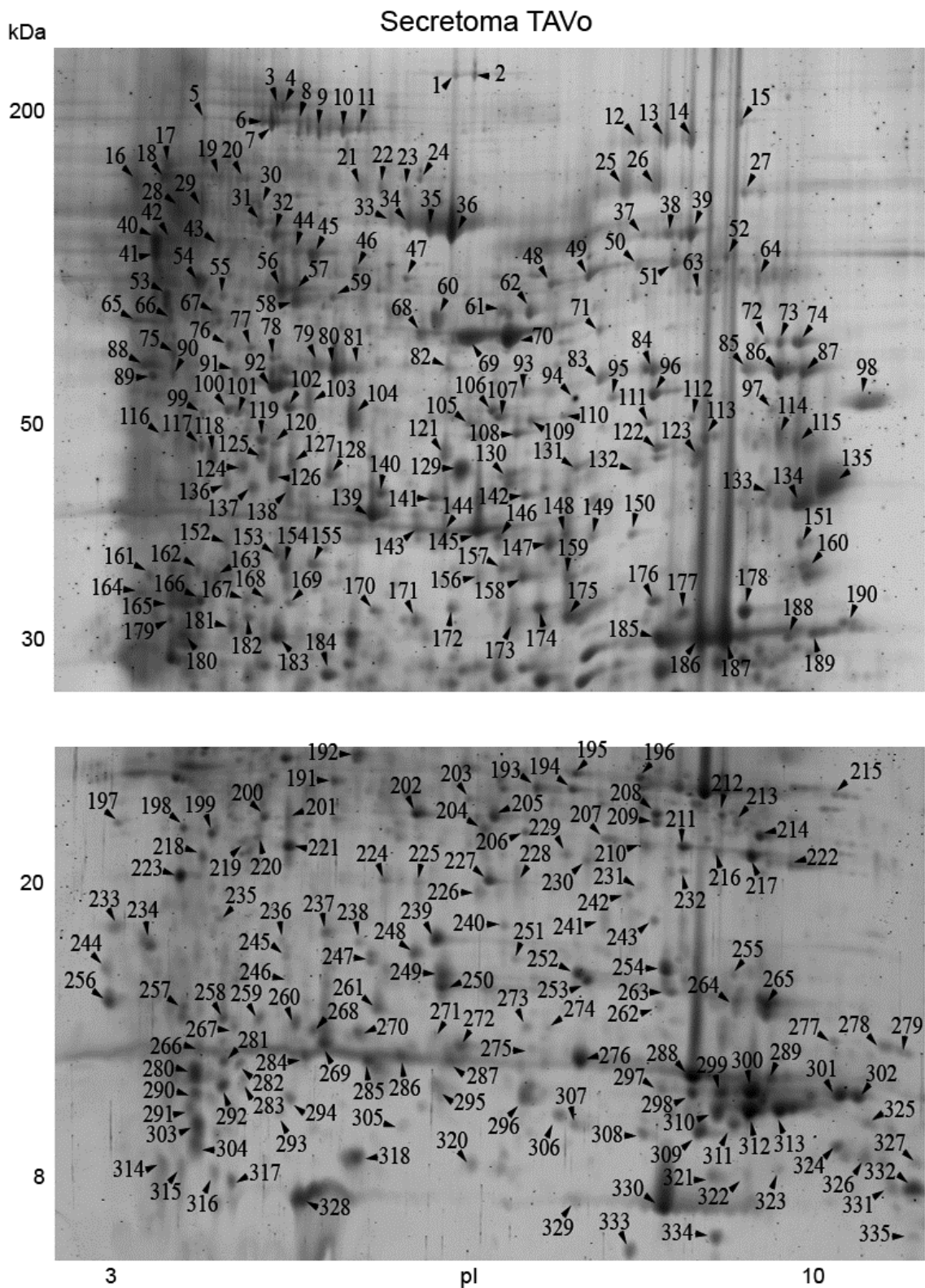


Figura 52: Mapa 2-DE de secreción del TAVo. Las manchas numeradas fueron seleccionadas para su identificación por espectrometría de masas. Imagen de arriba: gel de electroforesis realizado al 10% de acrilamida/bisacrilamida; imagen de abajo: gel realizado al 15% de acrilamida/bisacrilamida.

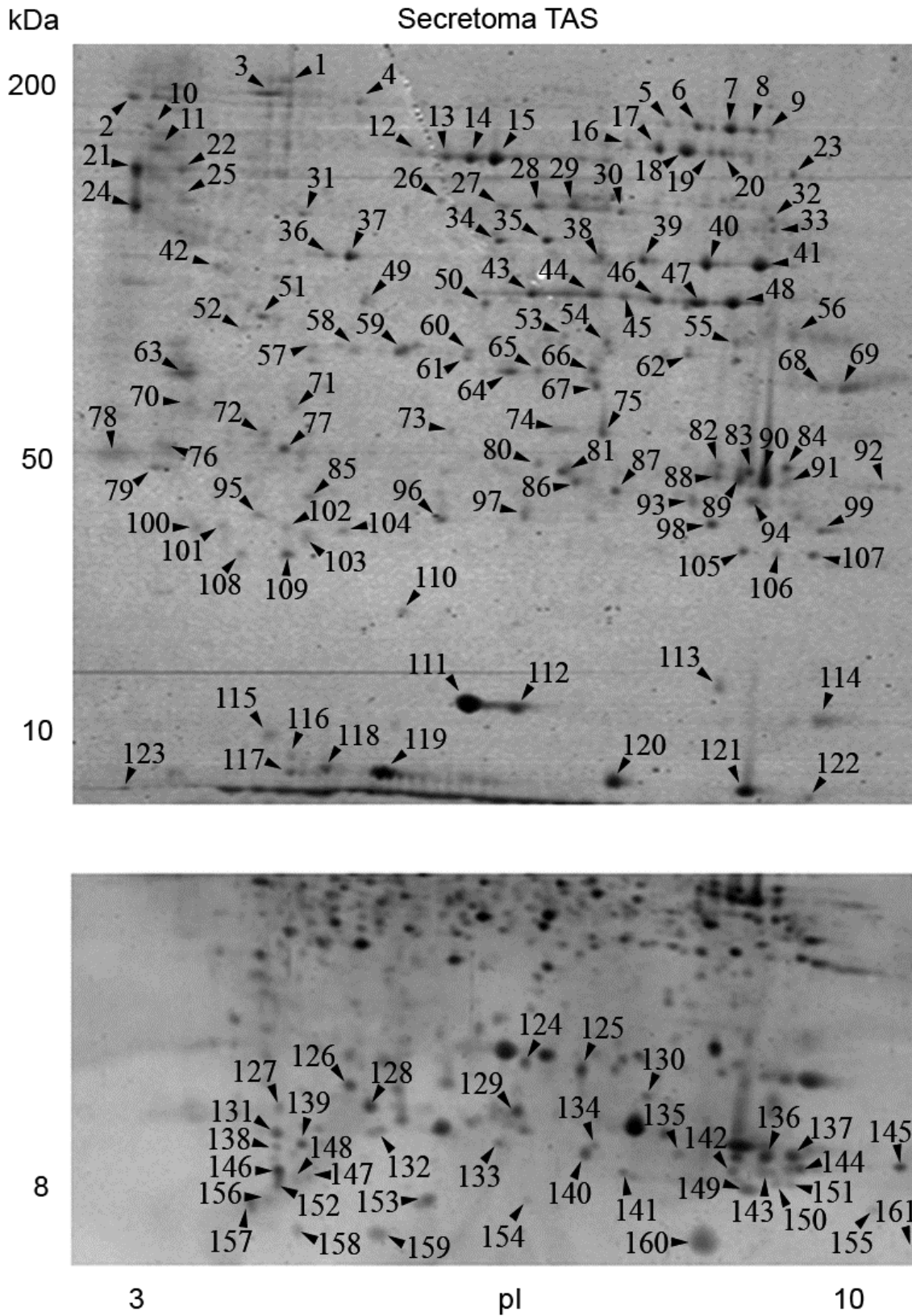


Figura 53: Mapa 2-DE de secreción del TAS. Las manchas numeradas fueron seleccionadas para su identificación por espectrometría de masas. Imagen de arriba: gel de electroforesis realizado al 10% de acrilamida/bisacrilamida; imagen de abajo: gel realizado al 15% de acrilamida/bisacrilamida.

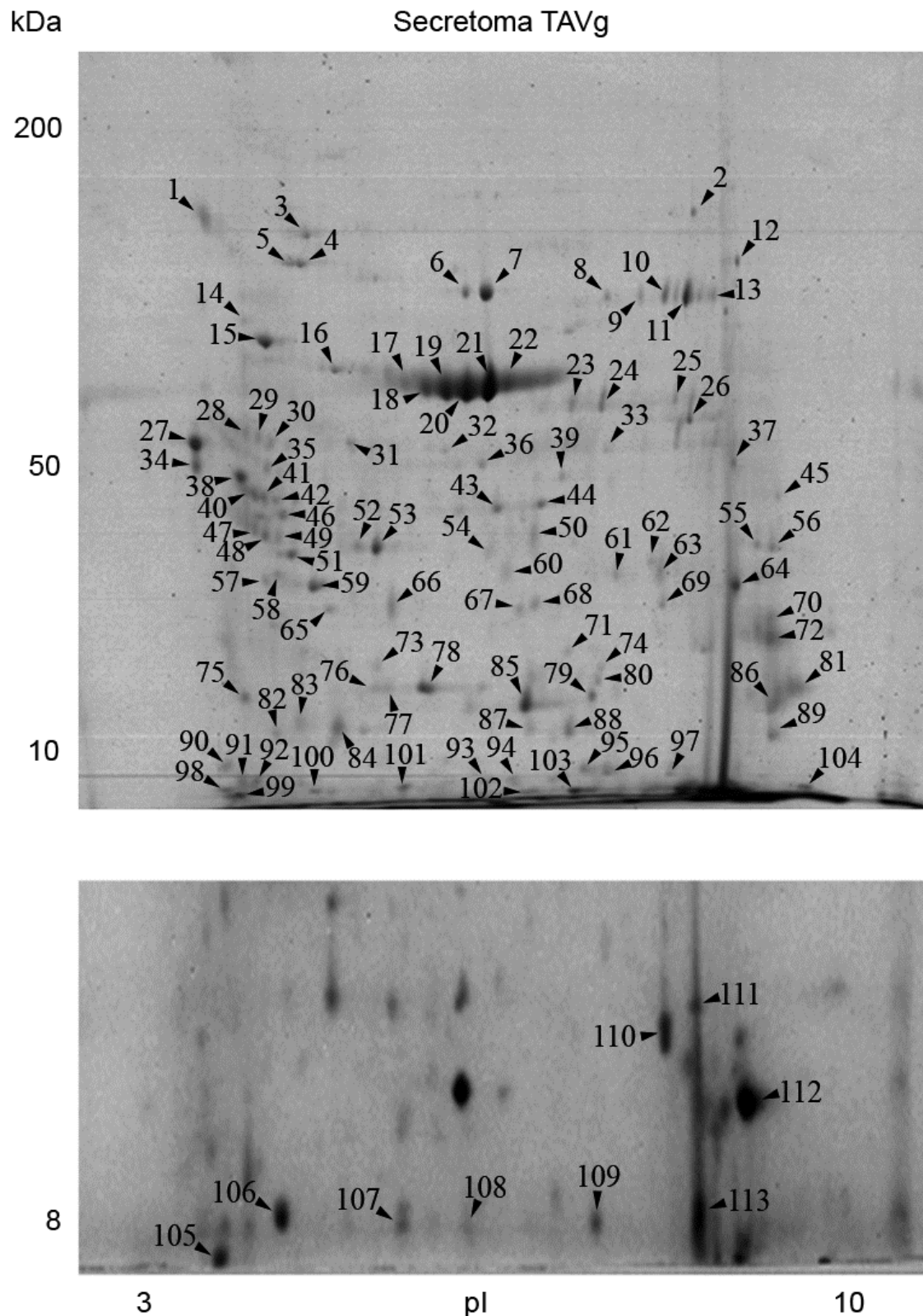


Figura 54: Mapa 2-DE de secreción del TAVg. Las manchas numeradas fueron seleccionadas para su identificación por espectrometría de masas. Imagen de arriba: gel de electroforesis realizado al 10% de acrilamida/bisacrilamida; imagen de abajo: gel realizado al 15% de acrilamida/bisacrilamida.

2.2 Proteínas secretadas procedentes de diferentes depósitos de tejido adiposo.

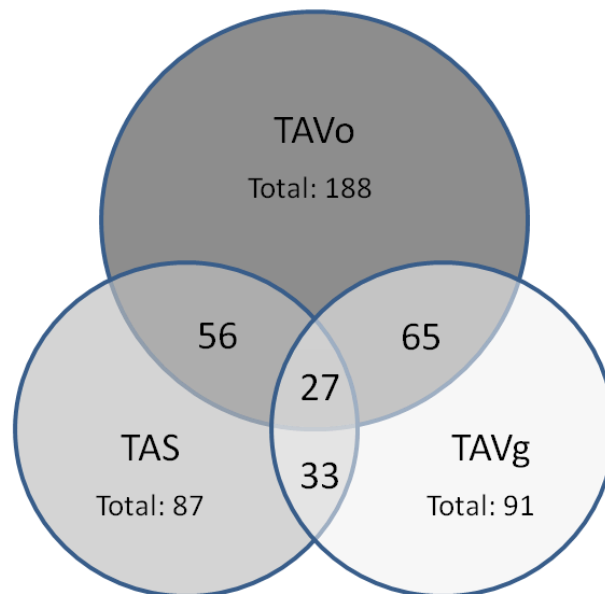
Las proteínas identificadas en los mapas de referencia fueron analizadas mediante el método de predicción basado en la secuencia aminoacídica proporcionado por el software SecretomeP 2.0 (Centre for Biological Sequence Analysis: <http://www.cbs.dtu.dk/services/secretomeP/>), de forma que se pudieran clasificar las proteínas como no secretadas o secretadas, y dentro de este grupo, si la secreción se producía por la presencia de un péptido señal (vía clásica) o por el contrario era debida a otro tipo de rutas de secreción (vía no clásica). Este método también ayudó a descartar a aquellas proteínas contaminantes procedentes de posibles roturas celulares debido a la manipulación y al tratamiento de los tejidos.

En los secretomas de TAVo se identificaron un 58.5 % de proteínas secretadas (un 17 % por la presencia de un péptido señal y un 41.5 % por la vía no clásica), un 55 % en TAS (16 % con péptido señal y 39 % por la vía no clásica), y 55 % en TAVg (23 % con péptido señal y 32 % por la vía no clásica) (figura 55).

Al comparar entre sí las proteínas identificadas de los diferentes depósitos, se encontraron 27 comunes a los 3 depósitos (tabla 15, figura 55), 56 proteínas comunes a TAVo y TAS, 65 comunes a TAVo y TAVg, y 33 comunes si comparamos TAS con TAVg.

Entre las proteínas secretadas identificadas se detectaron adipoquinas conocidas, como es el caso de la adiponectina, proteína de unión al retinol 4, angiotensinógeno, factor de inhibición de la migración de macrófagos, haptoglobina y el componente P amiloide sérico (tablas 16, 17 y 18). Adicionalmente, se encontraron algunas proteínas descritas previamente en los secretomas de cultivos celulares de tejido adiposo de rata, como la proteína 1 tipo tioredoxina, vimentina, hemopexina y tioredoxina [152], o en el análisis del secretoma de TAV humano, como la alfa-1-inhibidor 3, nidogen-2, gelsolina, serotransferrina, proteína de 78 kDa regulada por glucosa, catepsina D, albúmina de suero, y la glucoproteína MUC18 [150]. Interesantemente, muchas otras proteínas identificadas (por ejemplo la calreticulina, osteocrina, proteína DJ-1, etc.) no han sido asociadas previamente al tejido adiposo (tablas 16, 17 y 18).

A.



B.

TA	Manchas cortadas	Total proteínas únicas identificadas	Total proteínas únicas secretadas	Tipos de secreción
TAVo	335	188	109 (58%)	Péptido señal: 31 (16.5%) No clásica: 78 (41%)
TAS	161	85	47 (54%)	Péptido señal: 13 (39%) No clásica: 34 (15%)
TAVg	113	91	49 (45%)	Péptido señal: 20 (22%) No clásica: 29 (32%)

Figura 55: Resumen de las proteínas identificadas en los mapas de secreción. A. Diagrama mostrando el número de proteínas comunes en los tres depósitos. B. Número y tipo de secreción de las proteínas identificadas en los secretomas analizados.

SecretomeP	Nombre de la proteína	Código Uniprot
0.512	Actin, gamma-enteric smooth muscle	ACTH_RAT
0.533	Alpha-enolase	ENOA_RAT
0.575	L-lactate dehydrogenase A chain	LDHA_RAT
0.598	Gamma-enolase	ENOG_RAT
0.693	Ubiquitin	UBIQ_CRIGR
0.698	Thioredoxin	THIO_RAT
0.797	Fatty acid-binding protein, adipocyte	FABP4_RAT
SignalP	Serum albumin	ALBU_RAT
SignalP	Cathepsin D	CATD_RAT
SignalP	78 kDa glucose-regulated protein	GRP78_RAT
SignalP	Guanine deaminase	GUAD_RAT
SignalP	Protein disulfide-isomerase	PDIA1_RAT
SignalP	Serotransferrin	TRFE_RAT
SignalP	Transthyretin	TTHY_RAT
SignalP	Calreticulin	CALR_RAT

Tabla 15: Proteínas secretadas identificadas comunes a los tres depósitos de tejido adiposo ordenadas según el índice otorgado por el software SecretomeP. SignalP: la proteína contiene péptido señal.

Número de mancha	SecretomeP 2.0	Nombre de la proteína	Código Uniprot
72-74	0.501	Fumarate hydratase, mitochondrial	FUMH_RAT
92	0.504	Actin, alpha cardiac muscle 1	ACTC_RAT
105, 108	0.507	Leukocyte elastase inhibitor A	ILEUA_RAT
147	0.507	Glutathione S-transferase omega-1	GSTO1_RAT
87	0.508	3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial	THIM_RAT
56, 257	0.510	Plastin-2	PLSL_MOUSE
93	0.512	Adenosylhomocysteinase	SAHH_RAT
92,155, 164, 200	0.512	Actin, gamma-enteric smooth muscle	ACTH_RAT
118, 148, 159, 173, 175	0.514	Purine nucleoside phosphorylase	PNPH_RAT
83	0.520	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial	IDHP_RAT
160	0.527	WD repeat-containing protein 1	WDR1_RAT
198	0.527	Translationally-controlled tumor protein	TCTP_RAT
285	0.529	Cystatin-B	CYTB_RAT
61, 65, 68, 82	0.533	Alpha-enolase	ENOA_RAT
204	0.537	Protein DJ-1	PARK7_RAT
61, 62	0.540	Selenium-binding protein 1	SBP1_RAT
259	0.540	Histone H2A type 1-E	H2A1E_RAT
156, 158	0.546	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD+],	GPDA_RAT
176	0.549	Nitrilase homolog 2	NIT2_RAT
216, 217	0.555	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	SODM_RAT
323,324	0.555	10 kDa heat shock protein, mitochondrial	CH10_RAT
289	0.560	Profilin-1	PROF1_RAT
218, 281, 293	0.562	Peroxiredoxin-2	PRDX2_RAT
128, 139, 140	0.568	L-lactate dehydrogenase B chain	LDHB_RAT
202	0.568	Proteasome subunit beta type-4	PSB4_RAT
171	0.570	Nitrilase homolog 1	NIT1_RAT
259	0.572	Histone H2A.J	H2AJ_RAT
83, 84	0.573	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	IDHC_RAT
134	0.575	L-lactate dehydrogenase A chain	LDHA_RAT
199	0.579	Proteasome subunit beta type-6	PSB6_RAT
85	0.582	Citrate synthase, mitochondrial	CISY_RAT
182	0.583	F-actin-capping protein subunit beta	CAPZB_RAT
268	0.587	Grifin	GRIFN_RAT
127, 236	0.589	Keratin, type I cytoskeletal 10	K1C10_RAT
50, 51	0.591	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial	DLDH_RAT
297	0.593	Ribonuclease UK114	UK114_RAT
75, 89	0.595	Ribonuclease inhibitor	RINI_RAT
76	0.598	Gamma-enolase	ENOG_RAT
211, 306, 311, 318, 320	0.598	Peroxiredoxin-1	PRDX1_RAT
90	0.601	Vimentin	VIME_RAT
146	0.612	Pyridoxal kinase	PDXK_RAT
255,298,299, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 321	0.612	Hemoglobin subunit alpha-1/2	HBA_RAT
95	0.616	Fumarylacetoacetase	FAAA_RAT
67	0.617	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	ATPB_RAT
162	0.620	Enolase-phosphatase E1	ENOPH_RAT
112	0.623	3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase, mitochondrial	HIBCH_RAT
224, 237	0.623	Ferritin heavy chain	FRIH_RAT

(Continúa en la página siguiente)

Número de mancha	SecretomeP 2.0	Nombre de la proteína	Código Uniprot
290, 291	0.625	Nuclear transport factor 2	NTF2_RAT
60	0.627	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	ALDH2_RAT
255	0.628	Cofilin-1	COF1_RAT
242, 241, 274	0.628	Transgelin	TAGL_RAT
165	0.634	Aspartoacylase-2	ACY3_RAT
172	0.639	3-mercaptopyruvate sulfurtransferase	THTM_RAT
162, 167, 168	0.644	Glyoxalase domain-containing protein 4	GLOD4_RAT
223, 234	0.650	Proteasome subunit beta type-9	PSB9_RAT
201, 221	0.657	Abhydrolase domain-containing protein 14B	ABHEB_RAT
90	0.665	Desmin	DESM_RAT
131,15	0.674	Fumarylacetoacetate hydrolase domain-containing	FAHD2_RAT
244, 256	0.676	Calmodulin	CALM_RAT
128	0.680	3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase 1	BPNT1_RAT
99	0.689	Keratin, type I cytoskeletal 17	K1C17_RAT
328, 330, 331, 335	0.693	Ubiquitin	UBIQ_CRIGR
280	0.698	Thioredoxin	THIO_RAT
327, 329, 332	0.700	Histone H3.3	H33_RAT
99	0.705	Keratin, type I cytoskeletal 19	K1C19_RAT
309	0.706	Macrophage migration inhibitory factor	MIF_RAT
250, 251, 261, 274	0.728	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	SODC_RAT
133	0.731	Thiosulfate sulfurtransferase	THTR_RAT
184, 192	0.731	Carbonic anhydrase 5B, mitochondrial	CAH5B_RAT
308	0.759	Thioredoxin-dependent peroxide reductase,	PRDX3_RAT
278, 279	0.780	Galectin-3	LEG3_RAT
266, 267, 269, 270, 272, 275, 282, 284, 287-289, 295, 307	0.797	Fatty acid-binding protein, adipocyte	FABP4_RAT
163	0.808	Coatomer subunit epsilon	COPE_MOUSE
273	0.833	Transgelin-2	TAGL2_RAT
316, 317	0.848	Protein S100-A11	S10AB_RAT
277	0.851	Single-stranded DNA-binding protein, mitochondrial	SSBP_RAT
233	0.859	60S ribosomal protein L12	RL12_RAT
185, 207	0.888	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial	ECHM_RAT
163, 137	SignalP	Complement C3	CO3_RAT
132	SignalP	Alpha-1-inhibitor 3	A1I3_RAT
166	SignalP	Nidogen-2	NID2_MOUSE
77, 91	SignalP	Gelsolin	GELS_RAT
14, 25, 26, 29, 333, 334	SignalP	Serotransferrin	TRFE_RAT
17-19, 88, 161, 180	SignalP	78 kDa glucose-regulated protein	GRP78_RAT
28, 29, 33-36	SignalP	Serum albumin	ALBU_RAT
54, 119	SignalP	Protein disulfide-isomerase	PDIA1_RAT
259	SignalP	Protein disulfide-isomerase A3	PDIA3_RAT
123	SignalP	Fibrinogen beta chain	FIBB_RAT
52	SignalP	Succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase 1	SCOT1_RAT
81	SignalP	Guanine deaminase	GUAD_RAT
16, 21-23	SignalP	Hemopexin	HEMO_RAT
41, 42, 53, 66	SignalP	Calreticulin	CALR_RAT
154, 164, 136, 137	SignalP	Protein disulfide-isomerase A6	PDIA6_RAT

(Continúa en la página siguiente)

Número de mancha	SecretomeP 2.0	Nombre de la proteína	Código Uniprot
42	SignalP	Serine protease inhibitor A3K	SPA3K_RAT
98	SignalP	Aspartate aminotransferase, mitochondrial	AATM_RAT
55, 67	SignalP	Alpha-1-antiproteinase	A1AT_RAT
67	SignalP	Serine protease inhibitor A3N	SPA3N_RAT
28	SignalP	Serine protease inhibitor A3L	SPA3L_RAT
104	SignalP	Cathepsin D	CATD_RAT
110, 120	SignalP	Haptoglobin	HPT_RAT
43	SignalP	Alpha-2-HS-glycoprotein	FETUA_RAT
212	SignalP	Glutathione S-transferase Mu 2	GSTM2_RAT
212	SignalP	Glutathione S-transferase Yb-3	GSTM4_RAT
138	SignalP	Adiponectin	ADIPO_MOUSE
181	SignalP	Serum amyloid P-component	SAMP_RAT
228	SignalP	Retinol-binding protein 4	RET4_RAT
246	SignalP	7,8-dihydro-8-oxoguanine triphosphatase	8ODP_RAT
263	SignalP	Peroxiredoxin-5, mitochondrial	PRDX5_RAT
121, 260, 270	SignalP	Transthyretin	TTHY_RAT
87	SignalP	Osteocrin	OSTN_MOUSE

Tabla 16: Secretoma de TAVo. Proteínas secretadas identificadas ordenadas según el índice otorgado por el software *SecretomeP*. SignalP: la proteína contiene péptido señal.

Número de mancha	SecretomeP2.0	Nombre de la proteína	Código Uniprot
95	0.505	Actin, cytoplasmic 2	ACTG_RAT
31	0.510	Plastin-2	PLSL_MOUSE
33	0.514	Glutathione reductase (Fragment)	GSHR_RAT
78, 82, 83, 88	0.518	Carbonic anhydrase 2	CAH2_RAT
109	0.528	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	PEBP1_RAT
30	0.532	Mitogen-activated protein kinase 3	MK03_RAT
34, 39,40, 41	0.533	Alpha-enolase	ENOA_RAT
67	0.543	Ester hydrolase C11orf54 homolog	CK054_RAT
80	0.555	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	HPRT_RAT
107	0.555	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	SODM_RAT
139	0.562	Peroxiredoxin-2	PRDX2_RAT
117, 119	0.566	Fatty acid-binding protein, heart	FABPH_RAT
96	0.568	Proteasome subunit beta type-4	PSB4_RAT
69	0.575	L-lactate dehydrogenase A chain	LDHA_RAT
100	0.579	Proteasome subunit beta type-6	PSB6_RAT
34, 38, 39, 40,41	0.598	Gamma-enolase	ENOG_RAT
141,150, 151, 153	0.598	Peroxiredoxin-1	PRDX1_RAT
66	0.612	Pyridoxal kinase	PDXK_RAT
110	0.623	Ferritin heavy chain	FRIH_RAT
26	0.653	Sulfite oxidase, mitochondrial	SUOX_RAT
102, 104	0.657	Abhydrolase domain-containing protein 14B	ABHEB_RAT
116	0.682	Cellular retinoic acid-binding protein 1	RABP1_RAT
159	0.693	Ubiquitin	UBIQ_CRIGR
115, 126	0.694	Cellular retinoic acid-binding protein 2	RABP2_RAT
127	0.698	Thioredoxin	THIO_RAT
149	0.706	Macrophage migration inhibitory factor	MIF_RAT
111,112, 124	0.728	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	SODC_RAT
35	0.735	Dipeptidyl-peptidase 1	CATC_RAT
118, 128	0.737	Coactosin-like protein	COTL1_MOUSE
152	0.758	SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein 3	SH3L3_MOUSE
118, 121	0.797	Fatty acid-binding protein, adipocyte	FABP4_RAT
130	0.863	Galectin-7	LEG7_RAT
84	SignalP	Collagen alpha-1(IV) chain	CO4A1_MOUSE
2	SignalP	Epithelial cadherin	CADH1_RAT
5-9, 16-20	SignalP	Serotransferrin	TRFE_RAT
10	SignalP	78 kDa glucose-regulated protein	GRP78_RAT
11, 12, 14,15	SignalP	Serum albumin	ALBU_RAT
27, 28,29	SignalP	Carboxylesterase 3	CES3_RAT
25, 51	SignalP	Protein disulfide-isomerase	PDIA1_RAT
32	SignalP	Succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase 1,mitochondrial	SCOT1_RAT
36, 37	SignalP	Guanine deaminase	GUAD_RAT
21, 24	SignalP	Calreticulin	CALR_RAT
49	SignalP	Cathepsin D	CATD_RAT
150	SignalP	Peroxiredoxin-4	PRDX4_MOUSE
125	SignalP	15.5 kDa fatty acid-binding protein	15.5 kDa FABP
129	SignalP	Transthyretin	TTHY_RAT

Tabla 17: Secretoma de TAS. Proteínas secretadas identificadas ordenadas según el índice otorgado por el software *SecretomeP*. SignalP: la proteína contiene péptido señal.

Número de mancha	SecretomeP 2.0	Nombre de la proteína	Código Uniprot
55, 56	0.501	Fumarate hydratase, mitochondrial	FUMH_RAT
58, 59	0.504	Actin, alpha cardiac muscle 1	ACTC_RAT
58, 59	0.505	Actin, cytoplasmic 2	ACTG_RAT
58, 59	0.505	Actin, aortic smooth muscle	ACTA_RAT
63	0.508	3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial	THIM_RAT
57, 59	0.512	Actin, gamma-enteric smooth muscle	ACTH_RAT
61, 96	0.514	Purine nucleoside phosphorylase	PNPH_RAT
90	0.518	Tropomyosin beta chain	TPM2_RAT
43, 44	0.533	Alpha-enolase	ENOA_RAT
39	0.540	Selenium-binding protein 1	SBP1_RAT
80	0.543	Ester hydrolase C11orf54 homolog	CK054_RAT
87, 88	0.546	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD+]	GPDA_RAT
97	0.549	Nitrilase homolog 2	NIT2_RAT
77, 78	0.568	L-lactate dehydrogenase B chain	LDHB_RAT
45	0.575	L-lactate dehydrogenase A chain	LDHA_RAT
61	0.576	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	IDHC_MOUSE
100	0.583	F-actin-capping protein subunit beta	CAPZB_RAT
9	0.589	Keratin, type I cytoskeletal 10	K1C10_RAT
43, 44	0.598	Gamma-enolase	ENOG_RAT
78, 111	0.612	Hemoglobin subunit alpha-1/2	HBA_RAT
69	0.616	Fumarylacetoacetase	FAAA_RAT
90	0.624	Tropomyosin alpha-1 chain	TPM1_RAT
67	0.634	Isovaleryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	IVD_RAT
32	0.653	Sulfite oxidase, mitochondrial	SUOX_RAT
113	0.693	Ubiquitin	UBIQ_CRIGR
105	0.698	Thioredoxin	THIO_RAT
93, 94, 101	0.731	Carbonic anhydrase 5B, mitochondrial	CAH5B_RAT
102	0.759	Thioredoxin-dependent peroxide reductase,	PRDX3_RAT
106, 108	0.797	Fatty acid-binding protein, adipocyte	FABP4_RAT
92	SignalP	Nidogen-2	NID2_MOUSE
55, 57, 58, 62	SignalP	Gelsolin	GELS_RAT
2, 10, 11, 13, 14	SignalP	Serotransferrin	TRFE_RAT
15, 90	SignalP	78 kDa glucose-regulated protein	GRP78_RAT
1	SignalP	Cell surface glycoprotein MUC18	MUC18_RAT
6, 7, 17-22	SignalP	Serum albumin	ALBU_RAT
38	SignalP	Protein disulfide-isomerase	PDIA1_RAT
52, 53	SignalP	Guanine deaminase	GUAD_RAT
50	SignalP	Tissue alpha-L-fucosidase	FUCO_RAT
35	SignalP	Angiotensinogen	ANGT_RAT
27, 34	SignalP	Calreticulin	CALR_RAT
46, 75, 82	SignalP	Protein disulfide-isomerase A6	PDIA6_RAT
40, 41, 42	SignalP	Alpha-1-antitrypsin	A1AT_RAT
40, 41, 48, 49, 51	SignalP	Serine protease inhibitor A3N	SPA3N_RAT
104	SignalP	Plasminogen activator inhibitor 1	PAI1_RAT
66	SignalP	Cathepsin D	CATD_RAT
28-30	SignalP	Alpha-2-HS-glycoprotein	FETUA_RAT
102	SignalP	Endoplasmic reticulum protein ERp29	ERP29_RAT
83, 84	SignalP	Adiponectin	ADIPO_MOUSE
60	SignalP	Transthyretin	TTHY_RAT
110	SignalP	Beta-2-microglobulin	B2MG_RAT

Tabla 18: Secretoma de TAVg. Proteínas secretadas identificadas ordenadas según el índice otorgado por el software *SecretomeP*. SignalP: la proteína contiene péptido señal.

Las potenciales interacciones entre las proteínas secretadas por los diferentes depósitos de tejido adiposo se analizaron utilizando el software *Ingenuity Pathway Analysis* IPA 8.0 (Ingenuity Systems, CA, EUA) (figuras 56-60). Estas rutas de interacción incluyen varios procesos biológicos enmarcados dentro de redes independientes para cada tejido adiposo. En este análisis se encontró una relación de las proteínas secretadas por el TAVo con la proteína Stat 3 y el complejo NFκB (figura 56). De manera adicional, muchas proteínas secretadas por este tejido se agruparon como implicadas en el metabolismo de carbohidratos (figura 57), y muchas de ellas asociadas directamente con el transportador de glucosa Glut4 (Glut4/SLC2A2) (figura 58). Se identificaron también interacciones indirectas entre las proteínas secretadas por el TAVo y las quinasas reguladoras de la señal extracelular (ERKs), y con el interferón gamma (IFNG).

En el caso de TAS, algunas proteínas secretadas estaban implicadas en la eliminación de radicales libres y en procesos pro-inflamatorios (figura 59). Finalmente, las redes en las que estaban implicadas algunas de las proteínas de los secretomas de TAVg indicaban su relación con la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH) (figura 60).

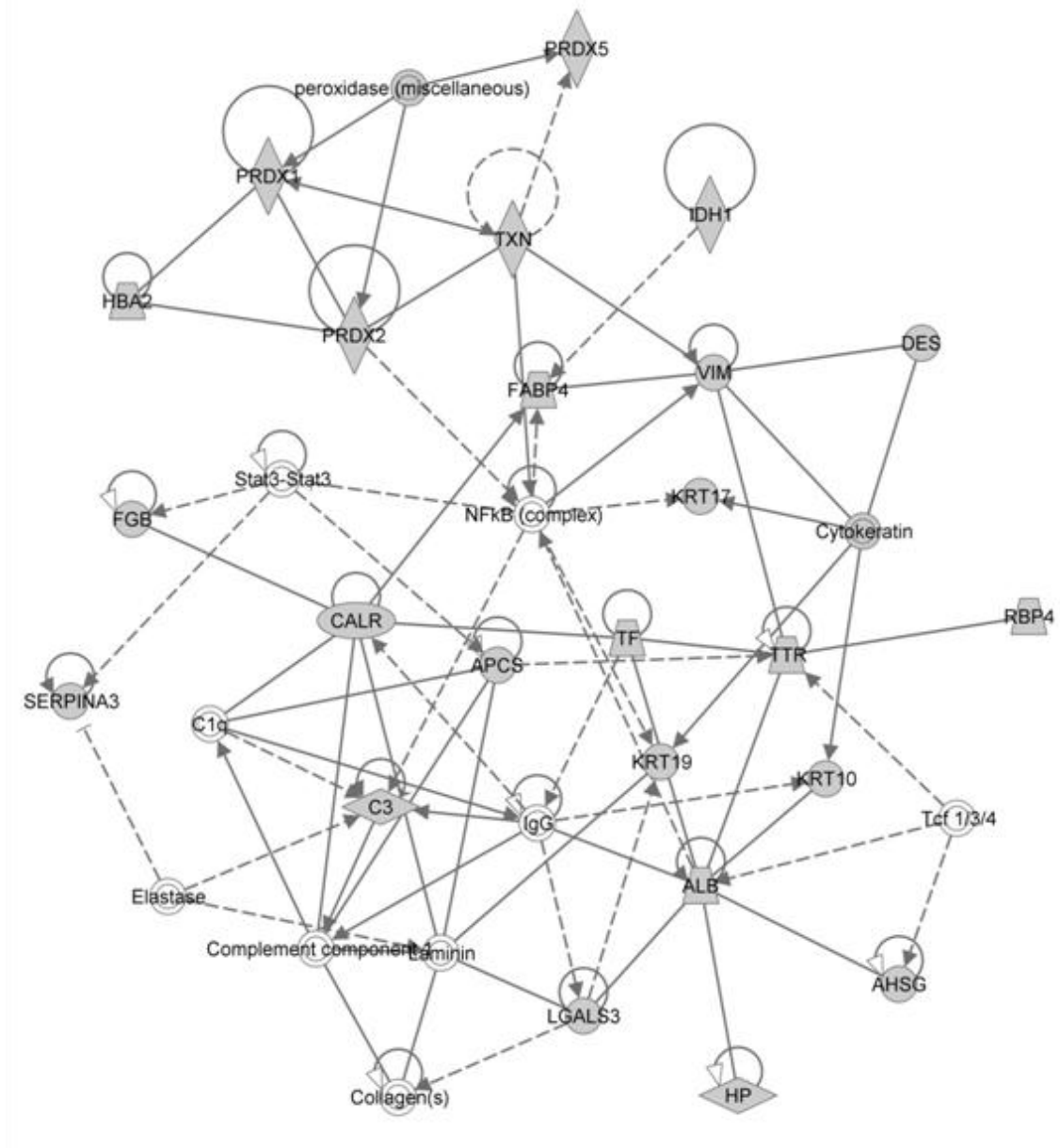


Figura 56: Red de interacciones 1 de las proteínas secretadas por el TAVo: Procesos bioquímicos de pequeñas moléculas, enfermedad neuronal y cáncer. Las proteínas identificadas se muestran con el nombre de su gen. Las líneas continuas representan interacciones directas, mientras que las discontinuas indirectas. Las flechas que van de un nodo proteico a otro indican que ese nodo actúa sobre el otro. Las líneas que carecen de flecha indican unión de las proteínas. Las líneas que presentan otra línea perpendicular al final de la misma representan inhibición. Los símbolos de los nodos significan: cuadrado – citoquina, rombo vertical – enzima, rombo horizontal – peptidasa, óvalo horizontal – regulador de la transcripción, trapecio – transportador y círculo – otros tipos.

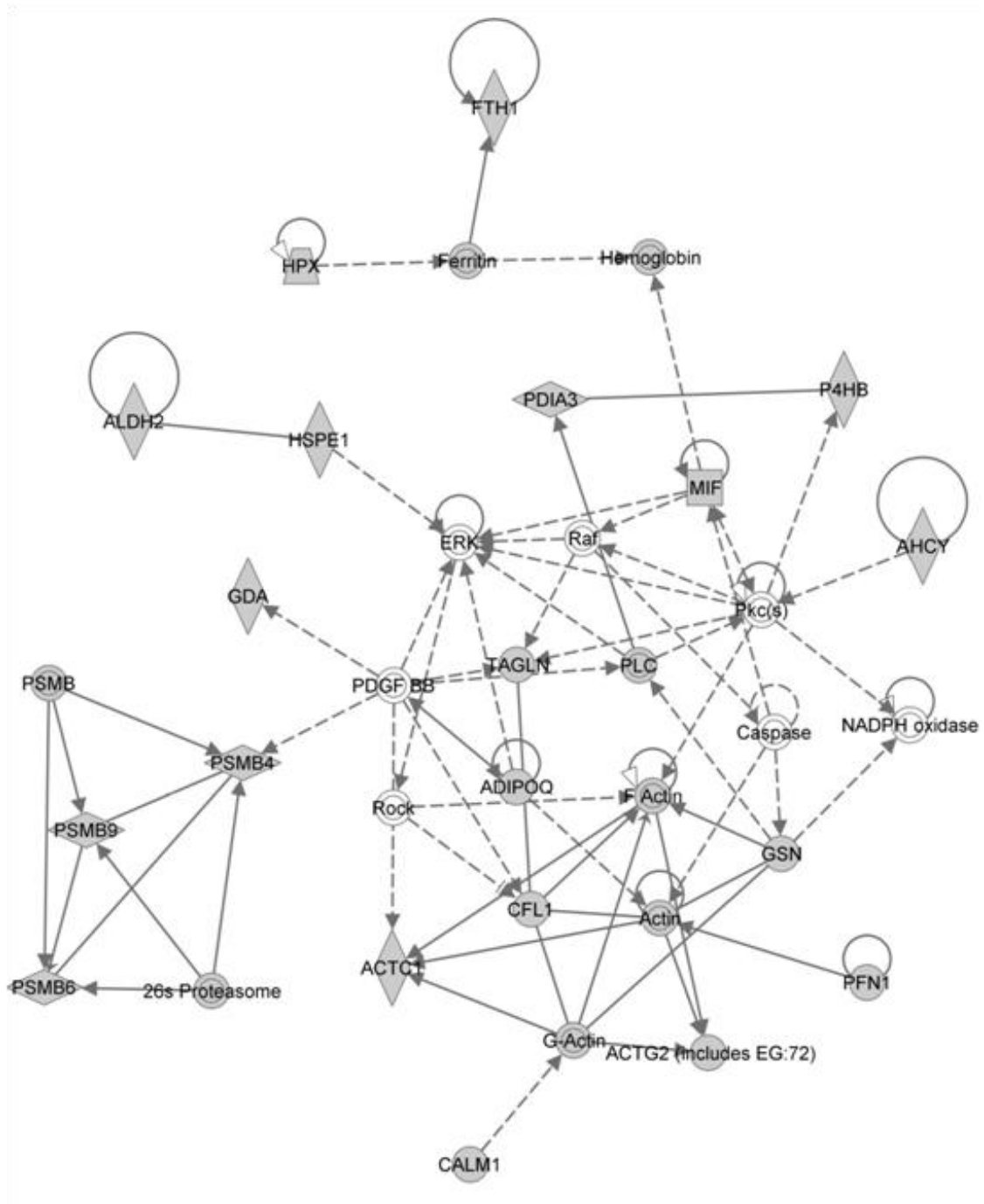


Figura 57: Red de interacciones 2 de las proteínas secretadas por el TAVo. A. Desarrollo y función del sistema cardiovascular, morfología orgánica, metabolismo de carbohidratos. B. Metabolismo de aminoácidos, procesos bioquímicos de pequeñas moléculas, expresión génica. Descripción en figura 56.

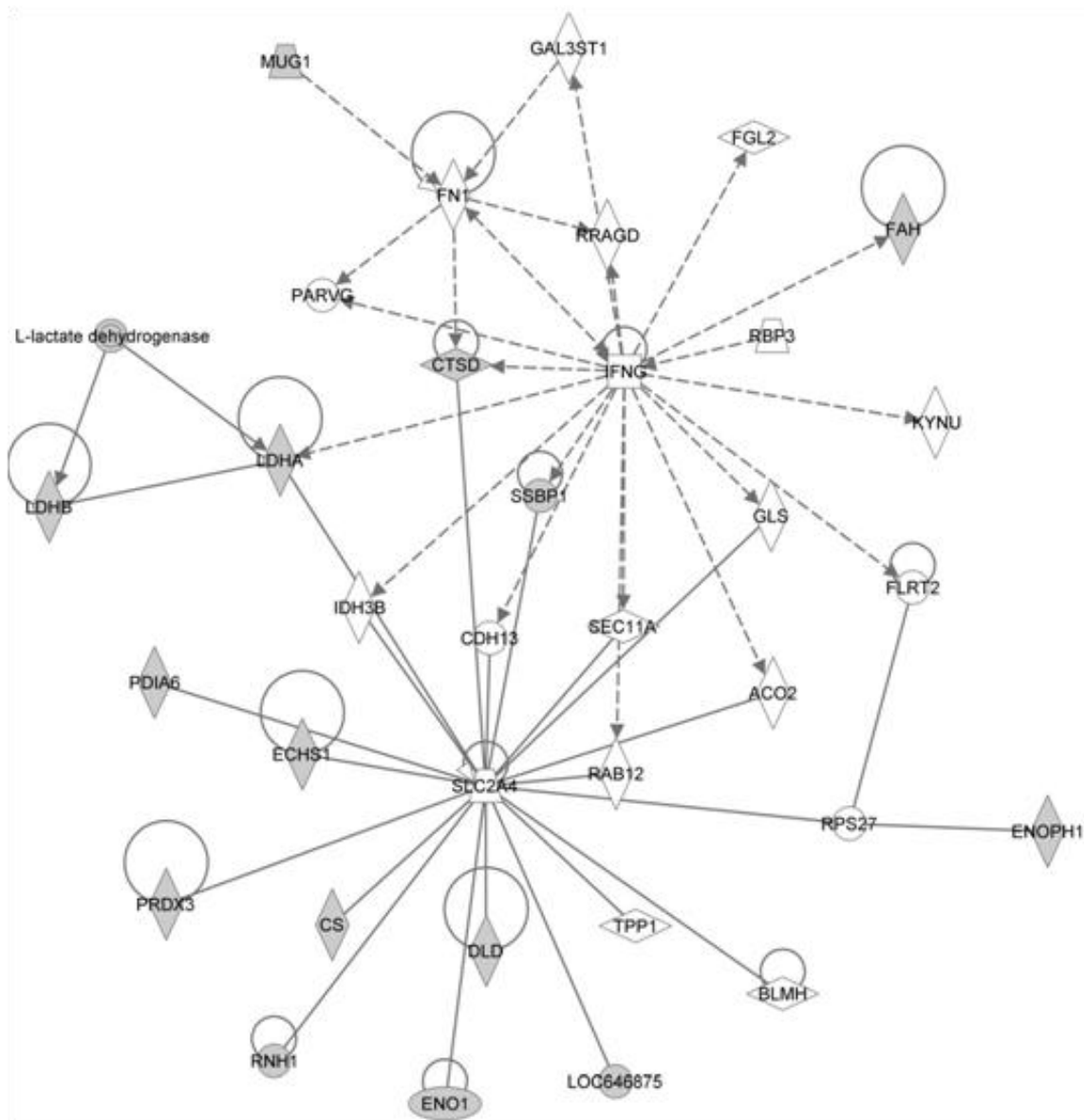


Figura 58: Red de interacciones 2 (A) y 3 (B) de las proteínas secretadas por el TAVo: Desarrollo y función del sistema cardiovascular, morfología orgánica, metabolismo de carbohidratos. Descripción en figura 56.

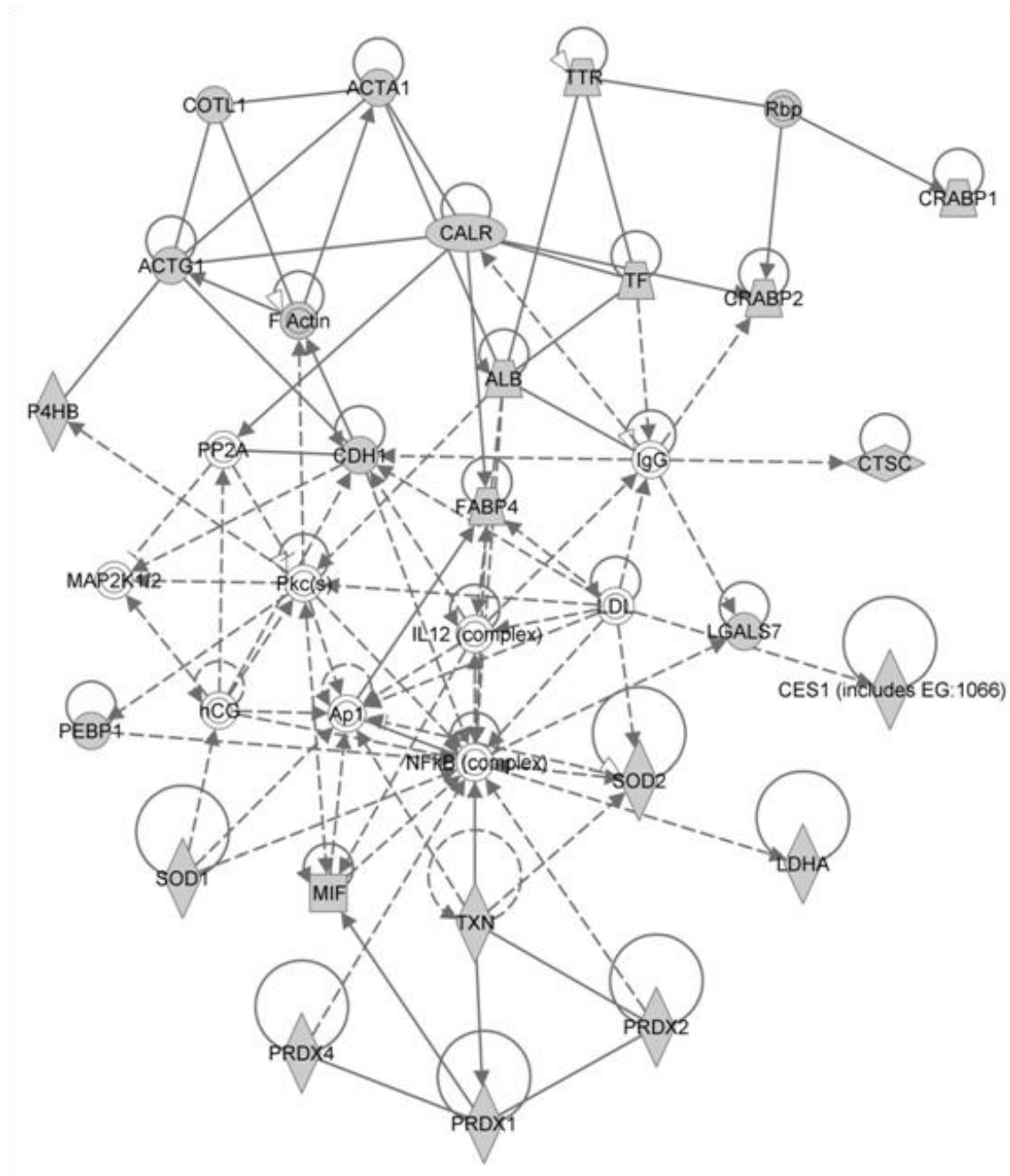


Figura 59: Red de interacciones de las proteínas secretadas por el TAS: Procesos bioquímicos de pequeñas moléculas, cáncer y oxidación causada por radicales libres. Descripción en figura 56.

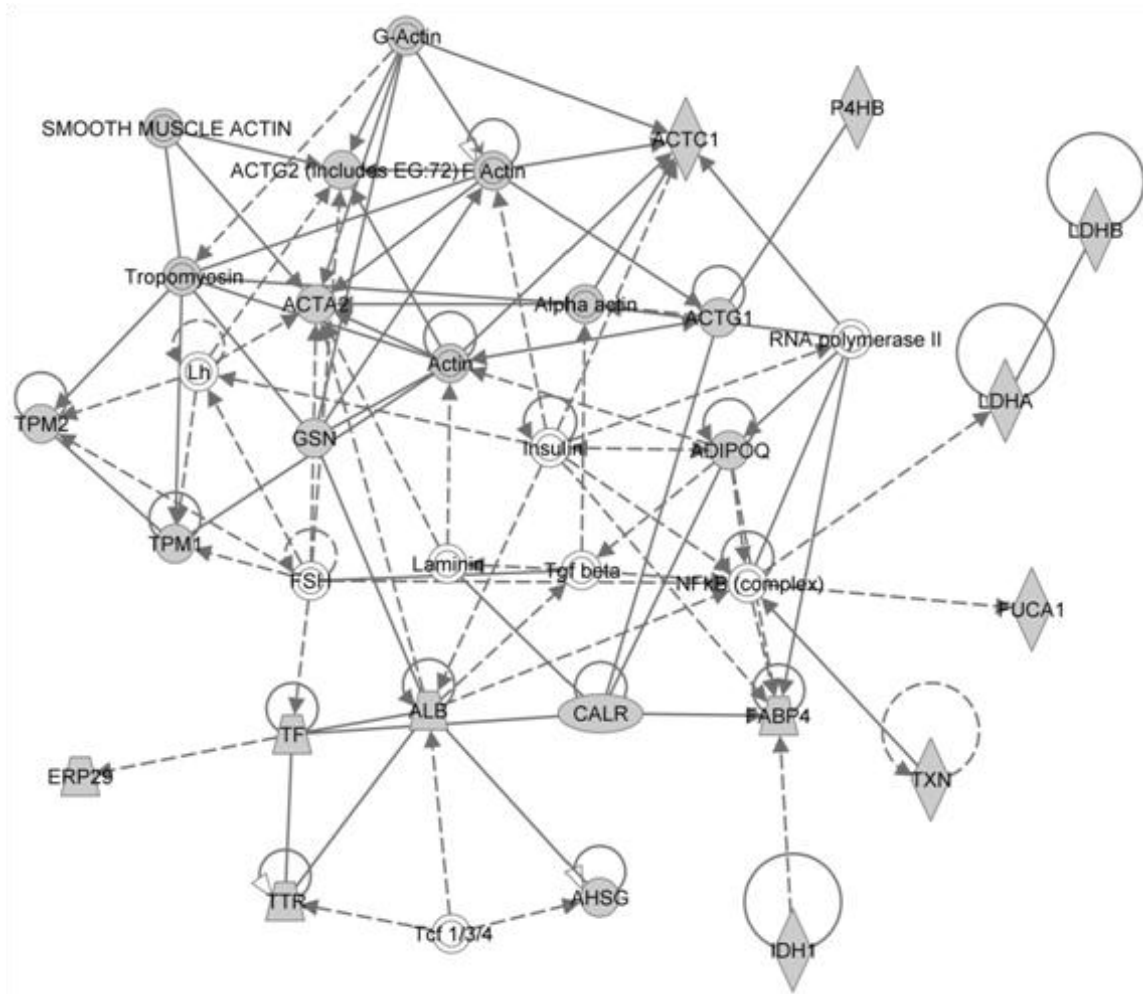


Figura 60: Red de interacciones de las proteínas secretadas por el TAVg: Ensamblaje y organización celular, metabolismo de aminoácidos y metabolismo de fármacos. Descripción en figura 56.

2.3 Análisis diferencial del secretoma de tejido adiposo visceral, subcutáneo y gonadal.

Se realizó un análisis de imagen diferencial mediante un software específico para 2-DE con el fin de determinar, de una manera cuantitativa, las diferencias de secreción entre los secretomas de los tres depósitos de tejido adiposo blanco procedentes de ratas en condiciones *ad libitum* (n=4 por grupo) (figuras 61A, 61B y 61C).

El análisis de los componentes principales (PCA) confirmó la baja variabilidad en el patrón de manchas dentro del mismo grupo, indicando la robusta similitud entre los secretomas procedentes de experimentos independientes. De la misma forma, este análisis mostró que los secretomas de TAVo y TAS difieren de una manera muy marcada entre ellos, mientras que existe una mayor similitud entre los secretomas de TAVo y TAVg (figura 61E).

A partir de una media de $1425 \pm SD23.7$, $1441 \pm SD14.4$ y $1529 \pm SD26.17$ manchas procedentes de secretomas de TAVo, TAS y TAVg respectivamente, se encontraron 204 diferencias significativas al comparar los tres secretomas con un valor $p < 0.05$, con una $p < 0.01$, y 45 diferencias con una $p < 0.001$. Se eligió la estadística más restrictiva para el análisis por espectrometría de masas, por lo que se cortaron 45 manchas para su identificación proteica (figura 61D); de estas, se identificaron 37 proteínas procedentes de 35 genes distintos (tabla 19). El 74 % de estas proteínas fueron clasificadas como secretadas, el 51 % por la vía no clásica y el 23 % por la vía clásica (apéndice, tabla suplementaria 4).

Es interesante destacar proteínas como la enoil-CoA hidratasa, adenosina quinasa, anhidrasa carbónica 5B, y la transgelina que fueron identificadas exclusivamente en los secretomas del TAVo y TAVg; mientras que una isoforma de gelsolina fue identificada únicamente en el secretoma del TAV. Adipoquinas o proteínas relacionadas con el tejido adiposo como la trombospondina-1, angiotensinógeno, proteína de unión a ácidos grasos y galectina-1, se encontraron más elevadas en el TAVo que en el TAS; mientras que por el contrario los niveles de secreción de la proteína de unión a vitamina D estaban más elevados en TAS (tabla 19).

Con el fin de validar el análisis diferencial, tras una búsqueda bibliográfica, se seleccionó de entre todas las proteínas identificadas la galectina-1 una proteína que no presenta péptido señal pero que sin embargo está descrita como secretada por la base de datos de proteínas Uniprot (Uniprot Consortium, <http://www.uniprot.org/>). El análisis por inmunodetección confirmó el estudio proteómico al mostrar que los niveles de esta proteína estaban más elevados en el TAVg que en el TAVo, y que este último presentaba mayores niveles de secreción que en el TAS (figura 61F).

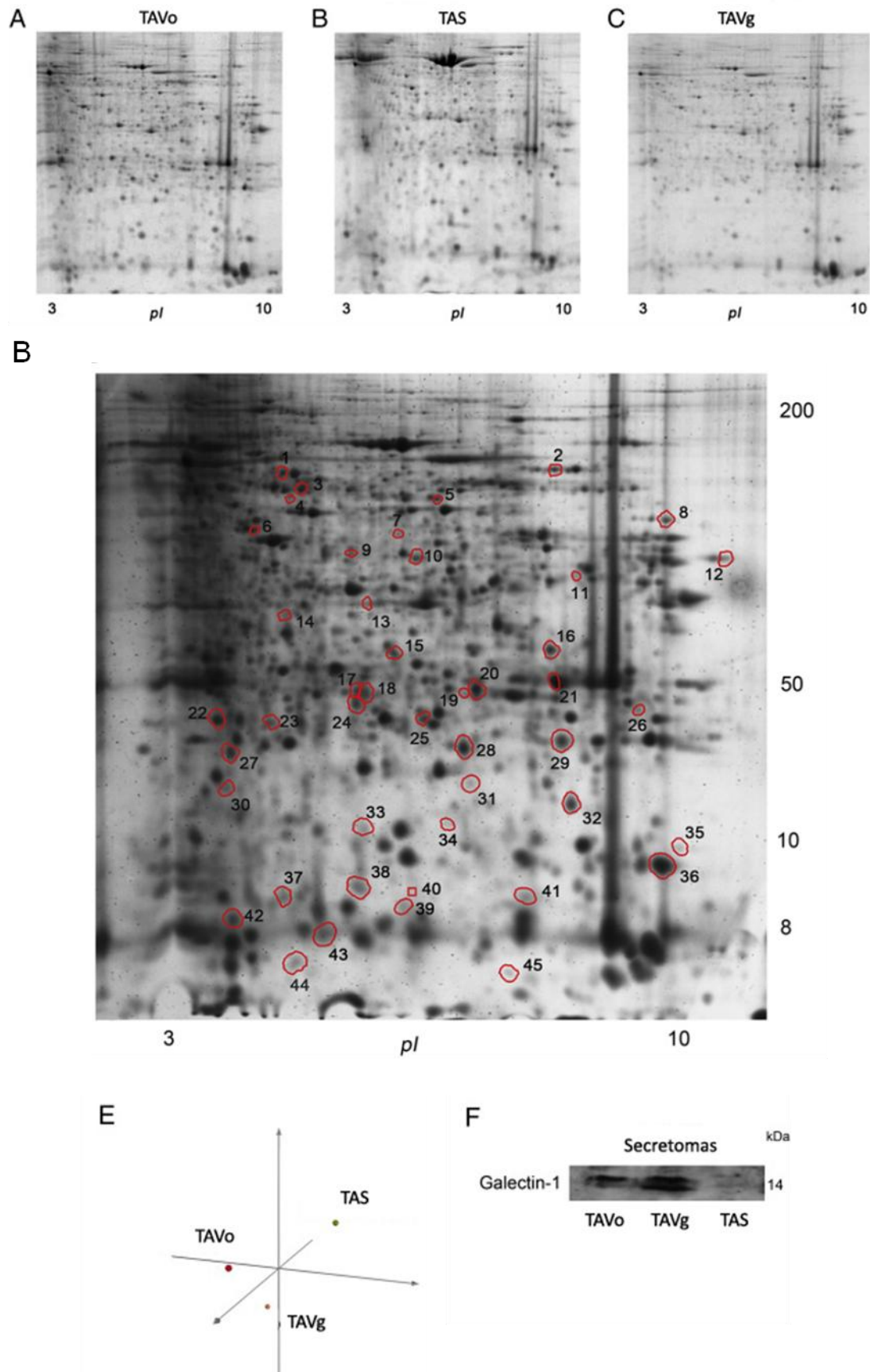


Figura 61: Análisis diferencial. A, B y C: Imágenes representativas 2-DE de los secretomas procedentes de los depósitos de TA estudiados; D. Localización de las manchas secretadas diferencialmente; E. Análisis de PCA; F. Validación por inmunodetección de galectina-1.

Número de mancha	SecretomeP 2.0	Nombre de la proteína	Código Uniprot	Presencia
1	0.320	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	CH60_RAT	G>V>S
36	0.324	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	PPIA_RAT	S>V>G
2	0.370	Catalase	CATA_RAT	V>G
26	0.385	AP-1 complex subunit beta-1	AP1B1_RAT	S>V>G
42	0.407 (secretada según Uniprot)	Galectin-1	LEG1_RAT	G>V>S
20	0.429	Proteasome subunit alpha type-6	PSA6_RAT	S>V>G
30	0.437	Thyroid hormone-inducible hepatic protein	THRSP_RAT	G>V>S
10	0.451	Alanine aminotransferase 1	ALAT1_RAT	G>V>S
7	0.477	Adenosine kinase	ADK_RAT	G>V
8	0.501	Fumarate hydratase, mitochondrial	FUMH_RAT	G>V>S
23	0.505	Actin, cytoplasmic 2	ACTG_RAT	V>G>S
9	0.505	Actin, cytoplasmic 2	ACTG_RAT	G>V>S
12	0.509	Aspartate aminotransferase, mitochondrial	AATM_RAT	G>V>S
22	0.527	Translationally-controlled tumor protein	TCTP_RAT	G>V>S
16	0.549	Omega-amidase NIT2	NIT2_RAT	V>G
27	0.562	Peroxiredoxin-2	PRDX2_RAT	G>V>S
35	0.582	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 L3	UB2L3_MOUSE	G>V>S
45	0.598	Peroxiredoxin-1	PRDX1_RAT	S>V>G
29	0.598	Peroxiredoxin-1	PRDX1_RAT	G>V>S
11	0.623	3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase, mitochondrial	HIBCH_RAT	V>G>S
38	0.628	Transgelin	TAGL_RAT	G>V
41	0.628	Transgelin	TAGL_RAT	V>G>S
32	0.628	Transgelin	TAGL_RAT	S>V>G
15	0.731	Carbonic anhydrase 5B, mitochondrial	CAH5B_RAT	V>S>G
25	0.759	Thioredoxin-dependent peroxide reductase	PRDX3_RAT	V>G>S
43	0.797	Fatty acid-binding protein	FABP4_RAT	S>G>V
17	0.888	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial	ECHM_RAT	V>G>S
21	0.888	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial	ECHM_RAT	G>V>S
18	signal peptide	Adiponectin	ADIPO_MOUSE	S>V>G
37	signal peptide	Protein disulfide-isomerase A6	PDIA6_RAT	V>G>S
4	signal peptide	Angiotensinogen	ANGT_RAT	G>V>S
3	signal peptide	Vitamin D-binding protein	VTDB_RAT	S>V>G
6	signal peptide	Gelsolin	GELS_RAT	V
40	signal peptide	Gelsolin	GELS_RAT	V>G>S
14	signal peptide	Thrombospondin-1	TSP1_MOUSE	V>G
24	signal peptide	Thrombospondin-1	TSP1_MOUSE	G>V>S
13	signal peptide	Murinoglobulin-1	MUG1_RAT	S>V>G

Tabla 19: Lista de proteínas identificadas en el análisis diferencial de los tres depósitos de TA estudiados. Las proteínas se muestran ordenadas según el índice otorgado por el software *SecretomeP*. SignalP: la proteína contiene péptido señal. Los niveles de presencia en cada tipo de tejido adiposo se indican en la última columna siendo S: TAS, V: TAVo, y G: TAVg.

3. Validación y caracterización de la fetuina A como nueva adipoquina.

En el estudio de caracterización de la secreción del tejido adiposo descrito en el apartado anterior, se identificó la proteína fetuina A (también conocida como alfa-2-HS-glicoproteína) como una posible adipoquina. Esta proteína había sido descrita anteriormente como una hepatoquina que actúa como inhibidor natural del receptor tirosina-quinasa de la insulina, relacionándose con procesos de resistencia a la misma y con incrementos de peso corporal [58]. Estos antecedentes determinaron la necesidad de centrarse en el estudio y caracterización de esta proteína como una posible adipoquina. El objetivo fue aportar un mayor conocimiento sobre la misma e integrar a la fetuina A del TA como una posible proteína implicada en la resistencia a insulina observada en la obesidad.

3.1 La fetuina A de tejido adiposo es secretada de forma exclusiva por los adipocitos maduros.

Para una mejor caracterización de la naturaleza de las células que están secretando fetuina A en el tejido adiposo, se analizó la secreción de esta proteína en cultivos primarios de TAS y TAV fraccionados. El estudio por inmunodetección en secretomas de estas células confirmó que los adipocitos maduros eran los responsables de la secreción de fetuina A en ambos casos, mientras que en los secretomas de las células del estroma vascular no se encontraron cantidades detectables de la proteína (figura 62).

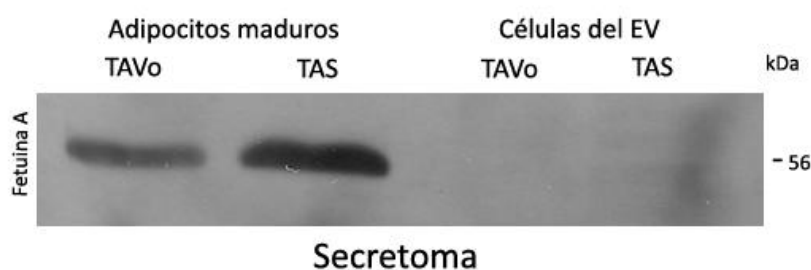


Figura 62: Caracterización de fetuina A en los adipocitos aislados procedentes de TA.

3.2 El tejido adiposo secreta varias formas fosforiladas de fetuina A.

El hígado secreta la proteína fetuina A de forma fosforilada [187], por lo que se estudió si en el tejido adiposo ocurría lo mismo. Dado que las fosforilaciones son complicadas de observar mediante un estudio de inmunodetección clásico, se separó la muestra de secretoma de TAVo mediante la técnica 2-DE, para realizar a

continuación un estudio de inmunodetección de fetuina A. Se pudieron observar diferentes manchas separadas por su punto isoeléctrico correspondiendo cada una de ellas a una forma fosforilada distinta de la misma proteína. Como control se utilizó suero de rata en el que se identificó el total de formas fosforiladas de fetuina A liberadas al torrente sanguíneo (figura 63); así se confirmó que el TA también produce las mismas, o al menos en parte, de las formas fosforiladas.

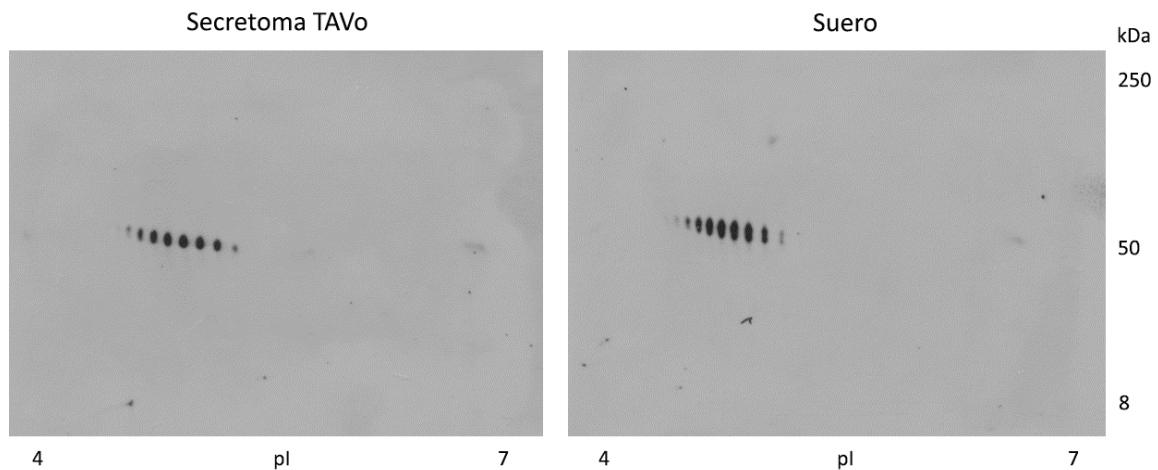


Figura 63: Imagen representativa de la inmunodetección en geles 2D de las distintas formas fosforiladas de fetuina A en suero y secretoma de TAVo.

3.3 Validación de la expresión de fetuina A en animales bajo diferentes condiciones fisiológicas o patológicas.

Los niveles de expresión de la fetuina A se analizaron en primer lugar a nivel de mensajero (ARNm), y posteriormente a nivel proteico. En concreto, los niveles de ARNm fueron analizados por RT-PCR en muestras de TA procedentes de los diferentes modelos animales previamente establecidos. Así, este primer análisis confirmó la capacidad del tejido adiposo blanco para expresar fetuina A y descartó una posible contaminación de la muestra con proteínas circulantes procedentes del hígado. Al estudiar el TAS y el TAVo en los diferentes grupos experimentales sorprendentemente se observó un notable incremento de los niveles de ARNm para fetuina A en los animales sometidos a ejercicio voluntario (figura 64A y 64C). En el caso de los animales obesos, se observó un patrón opuesto, mientras que los niveles de ARNm producidos por el TAVo se incrementaban en obesidad (aunque no de manera significativa, figura 64B), en el caso del TAS estos niveles se hayaron claramente disminuídos en situaciones de obesidad inducida por la dieta (figura 64D).

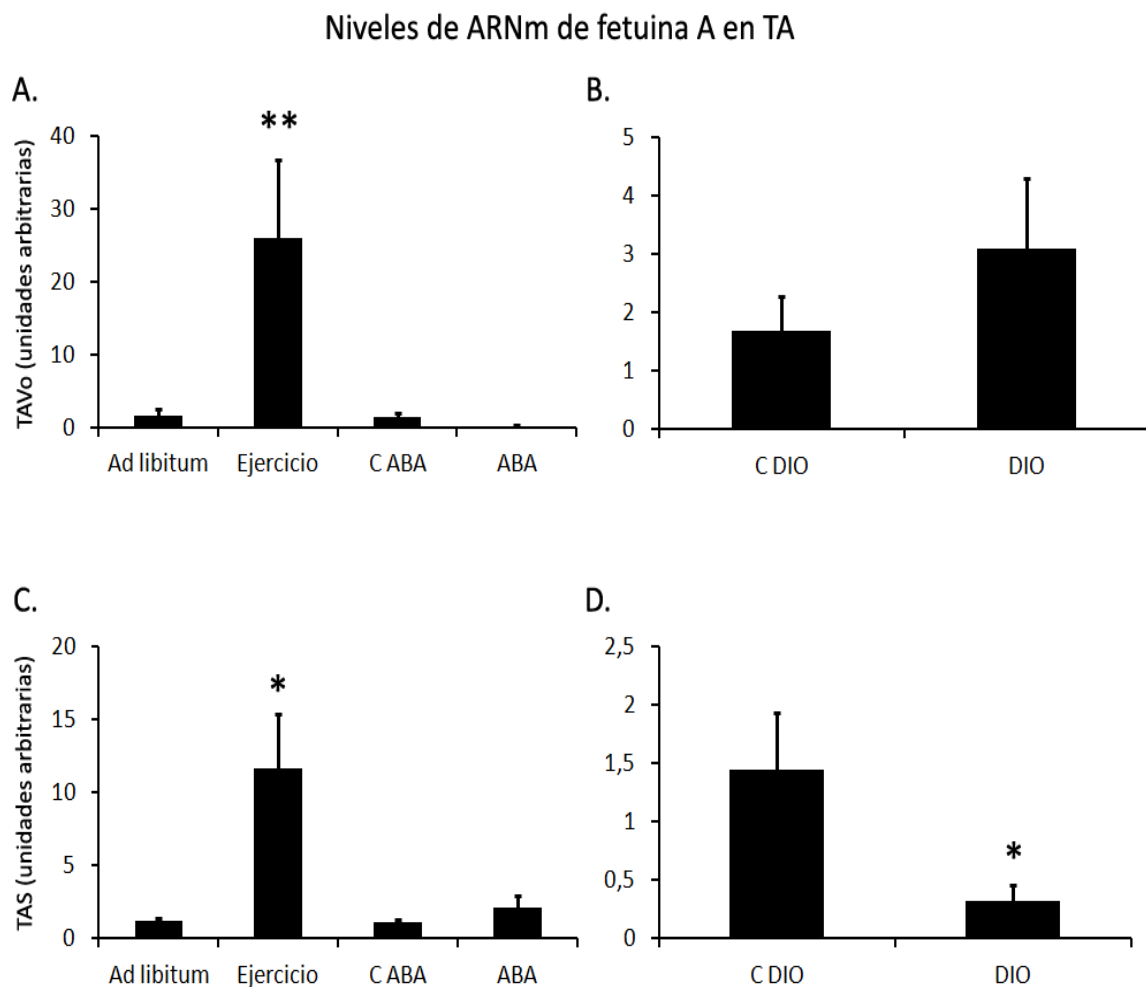


Figura 64: Niveles de ARNm de fetuina A en TAS (A, B) y TAVo (C, D). Las diferencias significativas se indican como * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ frente a *ad libitum* en el caso de las figuras A y C; y frente a CDIO en el caso de las figuras B y D.

A continuación se analizaron los niveles de fetuina A intracelular mediante inmunodetección en las mismas muestras de TA. Al analizar los niveles de expresión de esta proteína en el TAS se encontró que no existían variaciones significativas en los modelos de ejercicio y ABA (figura 65C). Sin embargo, en el caso del TAVo, tanto la restricción calórica como el ejercicio influyeron negativamente en la expresión de fetuina A (figura 65A). Por otro lado, se observó que ambos tejidos procedente de animales obesos presentaban niveles elevados de esta proteína.(figuras 65B y 65D).

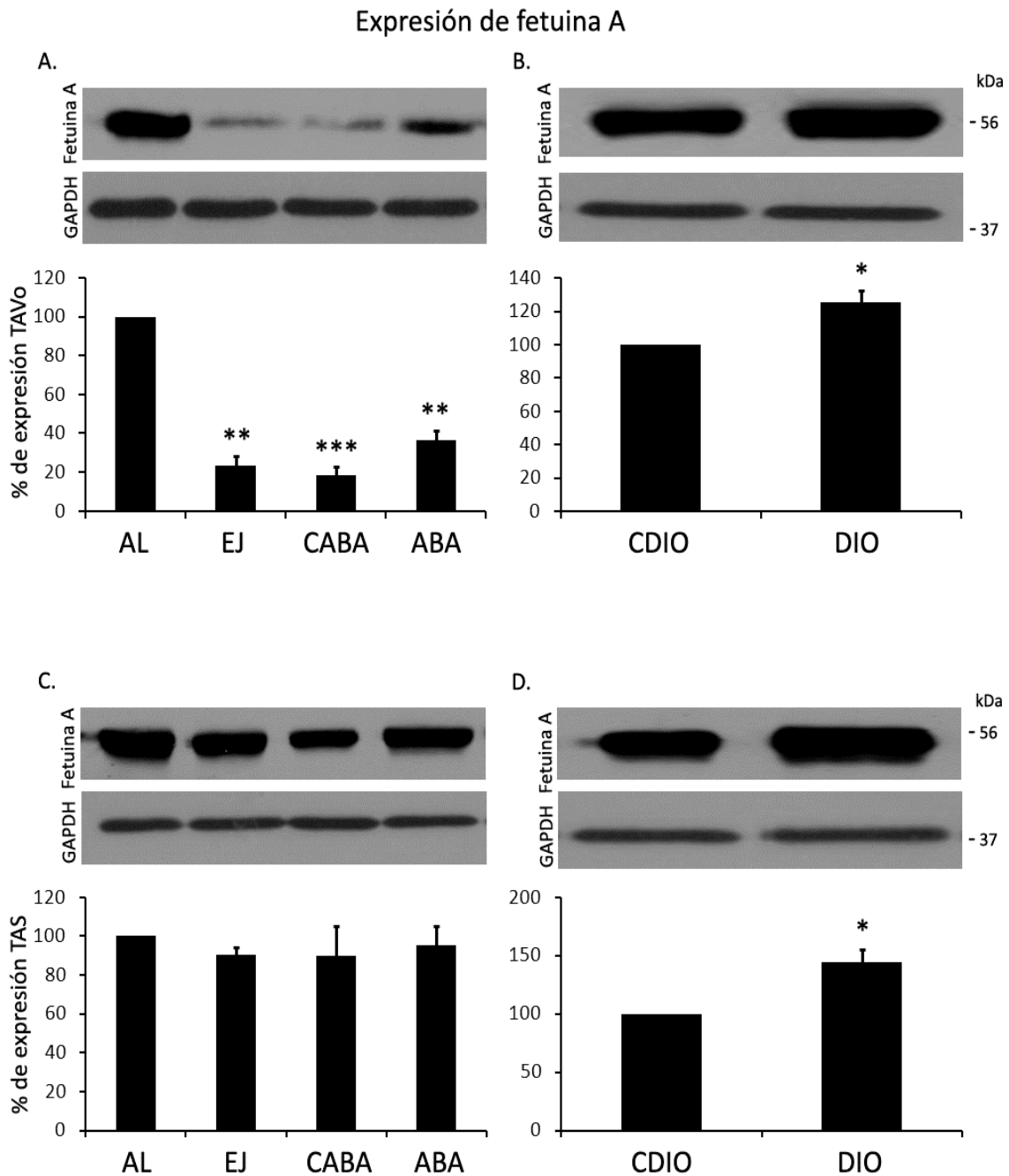


Figura 65: Niveles de fetuina A intracelular en TAVo (A, B) y TAS (C, D). Las diferencias significativas se indican como * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ frente a *ad libitum* en el caso de las figuras A y C; y frente a CDIO en el caso de las figuras B y D. AL: *ad libitum*; EJ: ejercicio.

3.4 Caracterización de la presencia de fetuina A en suero y secretomas de animales bajo diferentes condiciones fisiológicas o patológicas.

Los niveles de fetuina A circulantes 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 la restricción calórica producía un considerable incremento de los niveles circulantes de esta proteína; sin embargo, al añadir el factor del ejercicio voluntario en los animales ABA, los niveles de fetuina A disminuyeron drásticamente a pesar de que una semana de ejercicio por sí sola no afectaba a los niveles circulantes de esta proteína (figura 66A). Por otro lado, coincidiendo con lo descrito en la bibliografía [42], los animales obesos (DIO) mostraron un aumento significativo en los niveles de fetuina A circulantes (figura 66B).

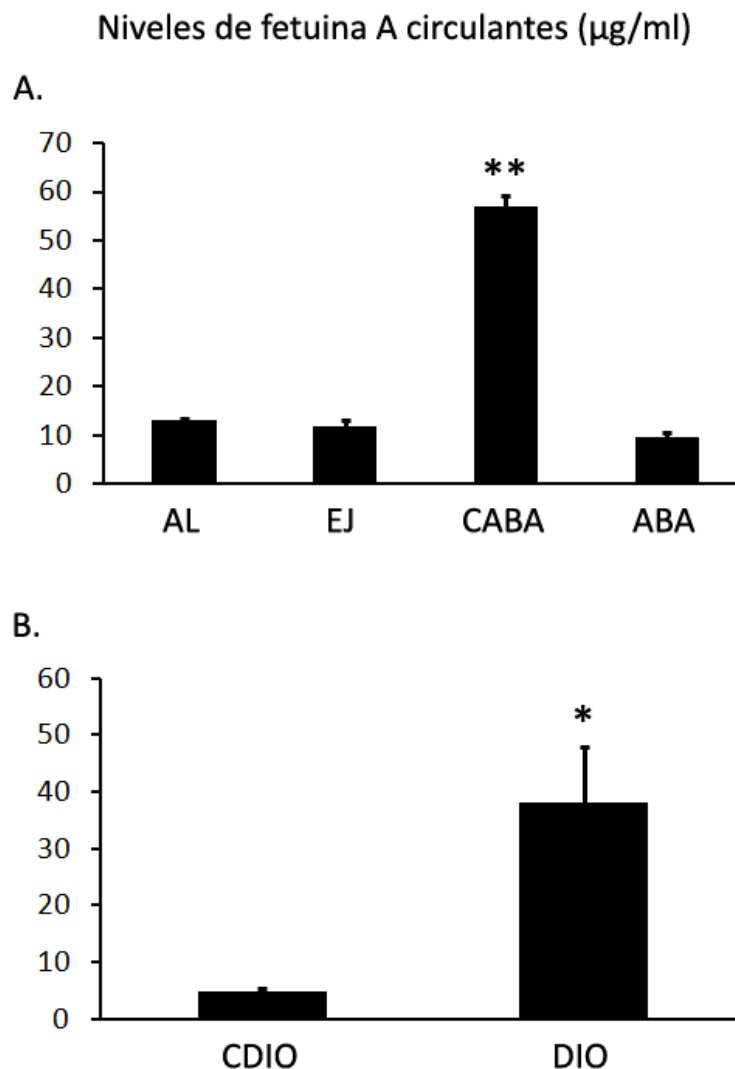


Figura 66: Niveles de fetuina A circulantes en los modelos animales estudiados. Las diferencias significativas se indican como * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ frente a *ad libitum* en el caso de la figuras A; y frente a CDIO en el caso de la figura B. AL: *ad libitum*; EJ: ejercicio.

En el caso de los secretomas directos a partir de explantes de tejido adiposo, se confirmó el hallazgo de los análisis por 2-DE encontrándose que tanto el TAVo como el TAS secretan fetuina A. No se encontraron variaciones significativas en ninguno de los modelos analizados en el caso del TAS, del mismo modo que se había observado en los estudios de expresión proteica (figura 67C); sin embargo, a diferencia de los niveles de expresión intracelular, no se observa un aumento significativo de la secreción por parte de este tejido en situaciones de obesidad (figura 67D). En el caso del TAVo, este presentó un notable descenso en los niveles de fetuina A secretada durante la restricción calórica independientemente del ejercicio físico (figura 67A). Sin embargo, fue interesante observar que en el TAVo procedente de animales obesos se incrementaba significativamente la secreción de esta proteína (figura 67B).

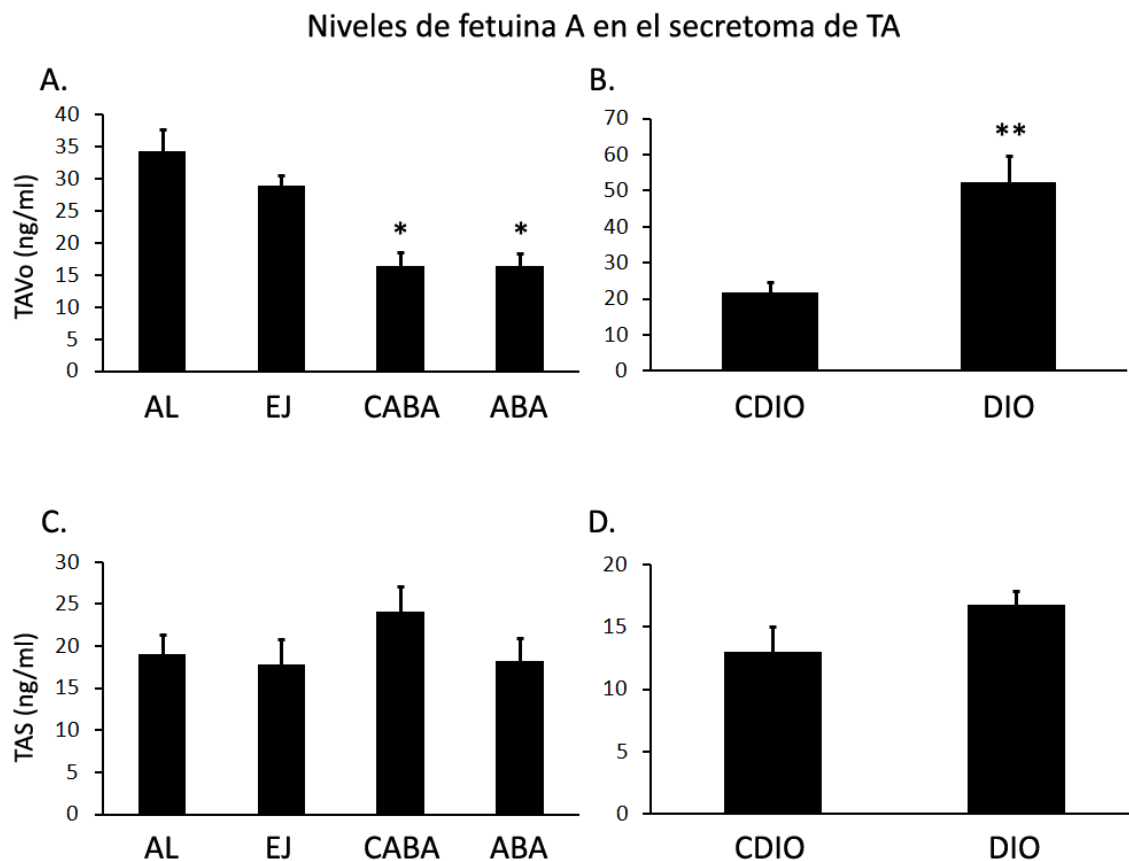


Figura 67: Niveles de fetuina A en los secretomas de TAVo (A, B) y TAS (C, D) procedentes de los modelos animales establecidos. Las diferencias significativas se indican como * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ frente a *ad libitum* en el caso de las figuras A y C; y frente a CDIO en el caso de las figuras B y D. AL: *ad libitum*; EJ: ejercicio.

4. Caracterización del secretoma de tejido muscular para la identificación de nuevas miokinas

4.1 Establecimiento y optimización de la incubación de explantes de tejido muscular de rata para el análisis de su secretoma y su alteración tras el ejercicio.

Debido a la inexistencia de bibliografía relacionada con el cultivo de explantes de tejido muscular esquelético para el análisis de su secreción, se procedió a realizar una caracterización previa tanto del tejido como de las condiciones de incubación para probar la viabilidad del modelo. Para ello se utilizaron músculos esqueléticos representativos de los tipos oxidativo (sóleo) y glucolítico (gastrocnemio) obtenidos de animales bajo condiciones *ad libitum* y ejercicio de los grupos previamente caracterizados.

En primer lugar se analizó la composición de los tipos de fibras musculares de cada uno de los tejidos mediante inmunohistoquímica para confirmar la naturaleza de los mismos, así como el efecto del ejercicio en la plasticidad muscular. Como era de esperar, los músculos sóleo y gastrocnemio presentaron patrones opuestos en relación a la distribución del tipo de fibras; el músculo sóleo se caracterizó por presentar una mayor cantidad de células con tinción positiva para la miosina lenta, mientras que el gastrocnemio para la miosina rápida (figura 66). Esta distribución se vio alterada tras 6 días de ejercicio voluntario, tras el cual ya se detectó un aumento de fibras del tipo I oxidativas en ambos músculos.

Tomando como punto de partida el protocolo de cultivo de explantes de tejido adiposo desarrollado por Álvarez-Llamas en 2007 [150] y trabajos previos de secreción a partir de células musculares en cultivo [168], se optimizaron las condiciones de procesado e incubación de los tejidos musculares hasta obtener los mejores perfiles de secreción en geles 2-DE; así el mapa de secreción óptimo para los tejidos musculares se obtuvo tras un tiempo de secreción de 12 horas (figura 69B). Además, para obtener una mejor resolución de los geles se tuvieron que eliminar las sales presentes en la muestra por filtración y optimizar el protocolo de extracción de las proteínas presentes en los secretomas, así como ajustar el rango de pH para la realización del isoelectroenfoco con el fin de eliminar gran parte de las contaminaciones originadas por la presencia de miosinas (figura 69A).

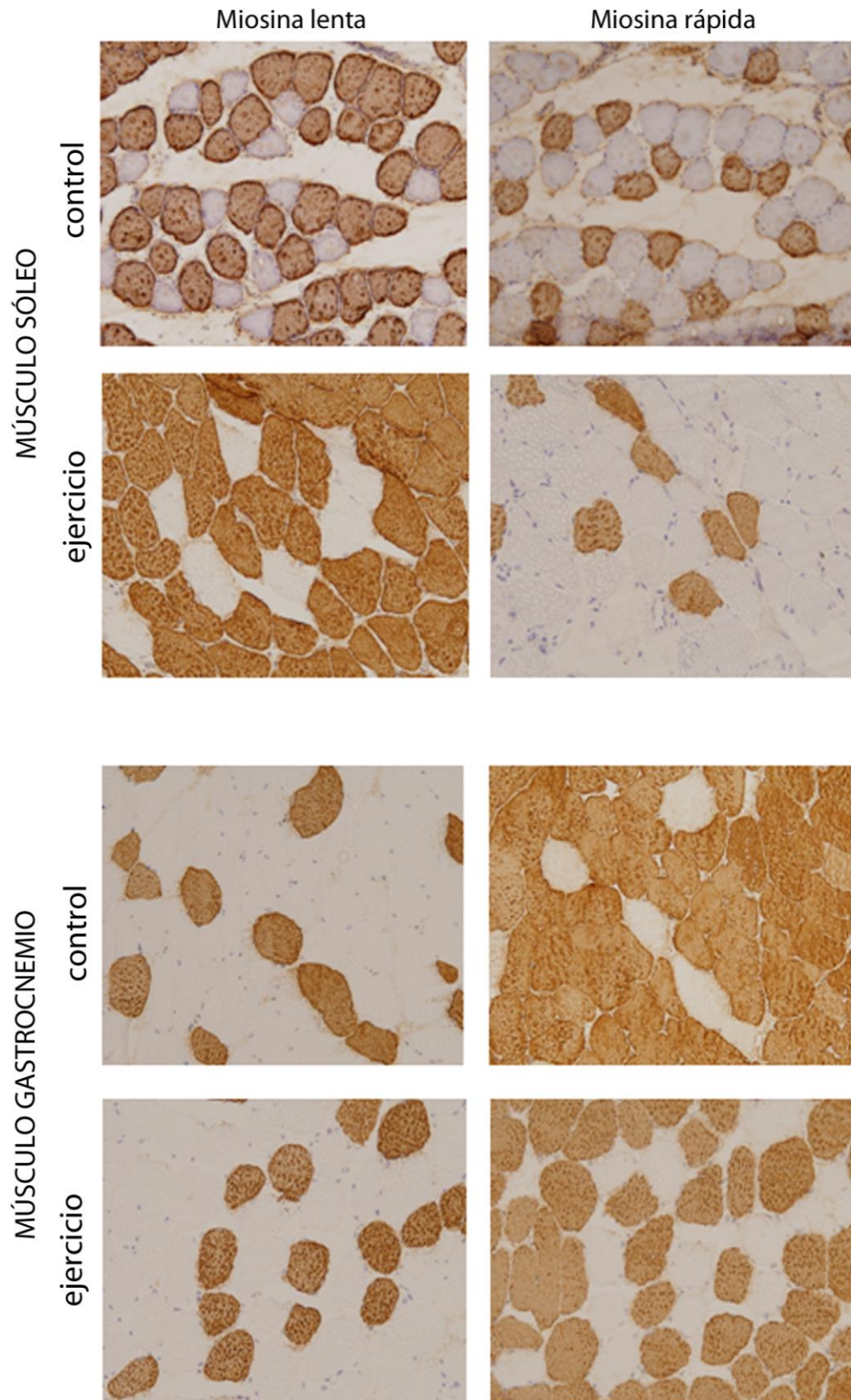


Figura 68: Imágenes de la inmunohistoquímica realizada para miosina lenta y rápida de los dos tipos musculares bajo condiciones *ad libitum* y de ejercicio. Imágenes tomadas mediante un microscopio óptico a un aumento de 10x.

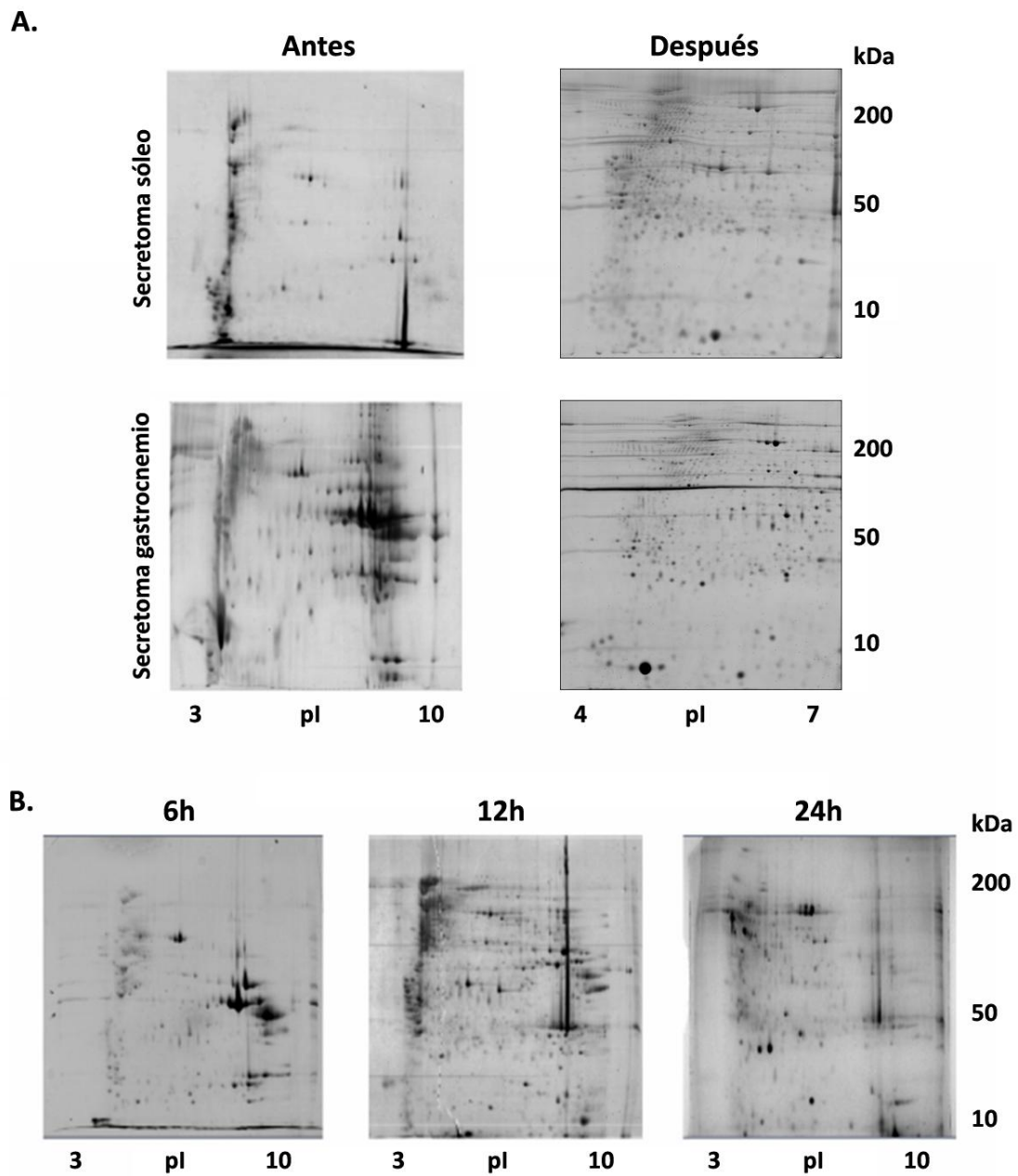


Figura 69: Imágenes representativas de los distintos procesos de optimización de los secretomas de tejido muscular. A. Geles 2-DE obtenidos antes y después de la optimización del protocolo de precipitación y eliminación de sales, así como el ajuste del pH del isoelectroenfoque para eliminar las contaminaciones de miosinas. B. Optimización de los tiempos de secreción (secretoma de gastrocnemio).

A continuación se hizo un estudio de viabilidad de los explantes de tejido muscular mediante un análisis de expresión de una mioquina representativa como es la IL-6 [132]. Para ello se analizaron los niveles de expresión a nivel de mensajero y proteína de la IL-6 a distintos tiempos de incubación observando que la viabilidad del tejido seguía intacta tras 12 horas de incubación *in vitro* (figura 70A). Por otro lado se

comprobó que esta miokina estaba presente en los secretomas de ambos tejidos en condiciones *ad libitum*, y que el músculo de tipo oxidativo secretaba más IL-6 que el glucolítico (figura 70B). Sin embargo no fue posible detectar un aumento de la secreción de esta interleuquina en los secretomas de músculos sometidos a una semana de ejercicio.

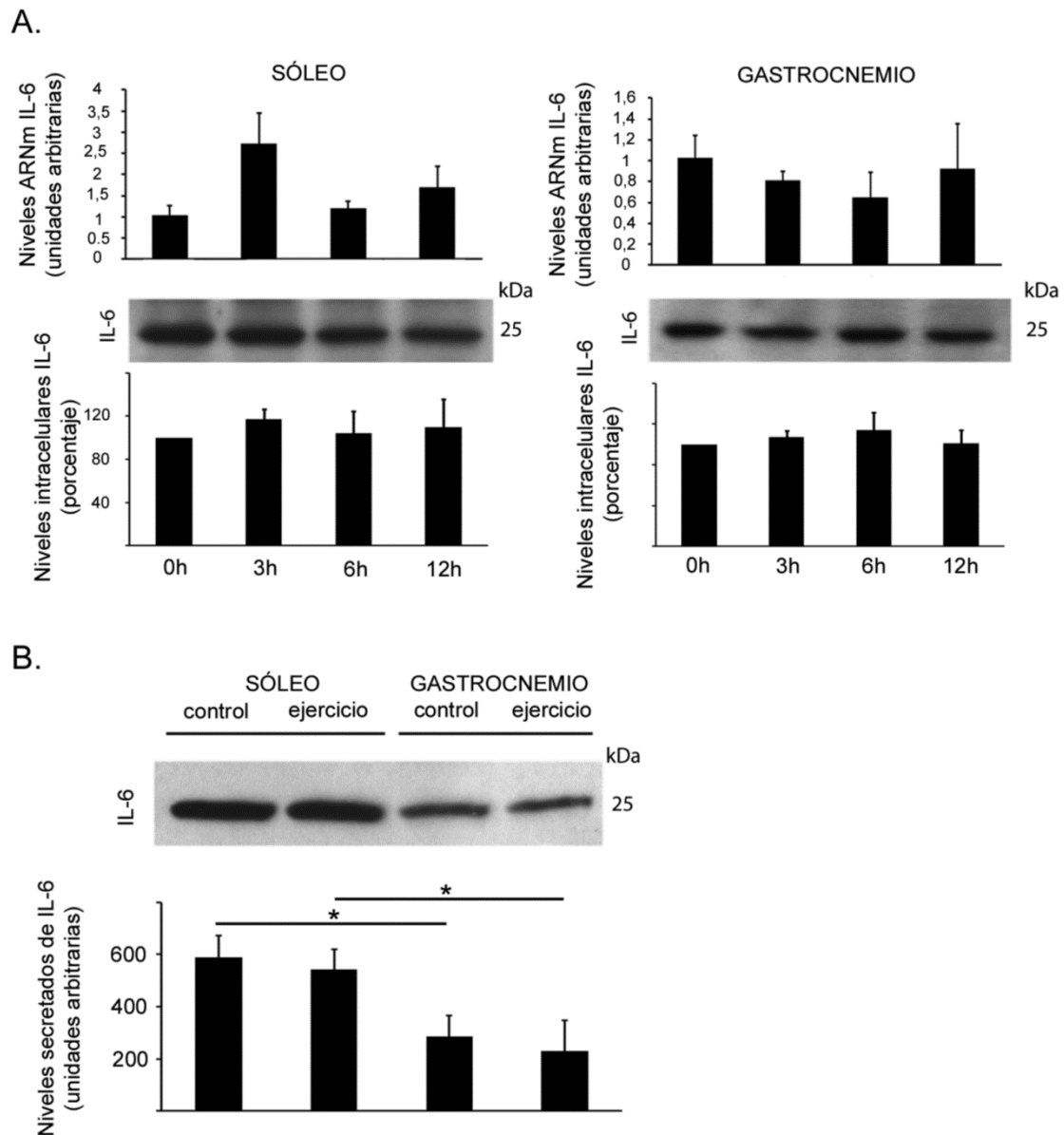


Figura 70 Comprobación de la viabilidad de los secretomas de tejido muscular. A. Niveles de expresión de ARNm y proteína intracelular de IL-6; B. Presencia de IL-6 en los secretomas a las 12 horas. Las diferencias significativas se indican como $*p < 0.05$.

4.2 Mapas 2-DE de referencia de los secretomas de tejido muscular glicolítico-rápido y oxidativo-lento.

Tras 12 horas de incubación de los explantes de tejido muscular, se recogieron los secretomas y se procesaron para su separación por 2-DE. De manera similar al estudio desarrollado con el tejido adiposo, se realizó una caracterización previa para generar mapas de referencia de las manchas más representativas de cada tipo muscular. En total se seleccionaron 200 y 206 manchas representativas del secretoma de gastrocnemio y sóleo respectivamente para ser analizadas por espectrometría de masas (figuras 71 y 72); de estas se identificaron 158 proteínas (66 diferentes) en gastrocnemio y 161 proteínas (93 diferentes) en sóleo (apéndice, tablas suplementarias 5, 6).

Entre todas las proteínas identificadas, se detectaron proteínas específicas de músculo como proteínas contráctiles (miosinas, actinas, tropomiosinas, troponinas, etc.) y proteínas citoplasmáticas (varias formas musculares de la enolasa, lactato deshidrogenasas, creatina quinasas, etc.). El 51.5 % de las proteínas identificadas en el secretoma de gastrocnemio fueron clasificadas como secretadas (45.5 % por la vía no clásica y un 6.1 % por la vía clásica), mientras que el porcentaje en sóleo fue del 51.6 % (42 % por la vía no clásica y un 9.7 por la vía clásica) (Figura 73). 11 proteínas identificadas fueron comunes a los dos tejidos (tabla 20).

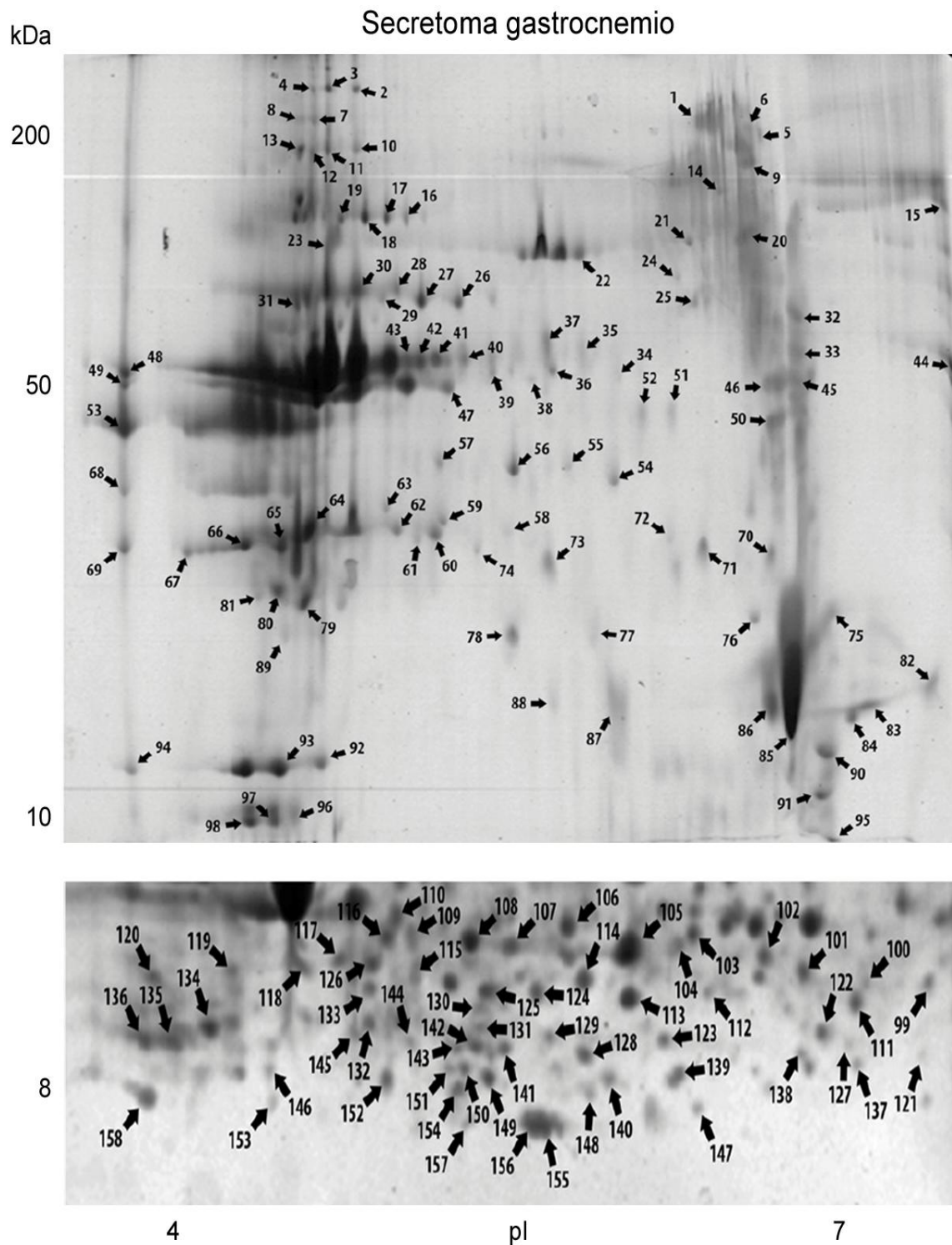


Figura 71: Mapa 2-DE de secreción del músculo gastrocnemio. Las manchas numeradas fueron seleccionadas para su identificación por espectrometría de masas. Imagen de arriba: gel de electroforesis realizado al 10% de acrilamida/bisacrilamida; imagen de abajo: gel realizado al 15% de acrilamida/bisacrilamida.

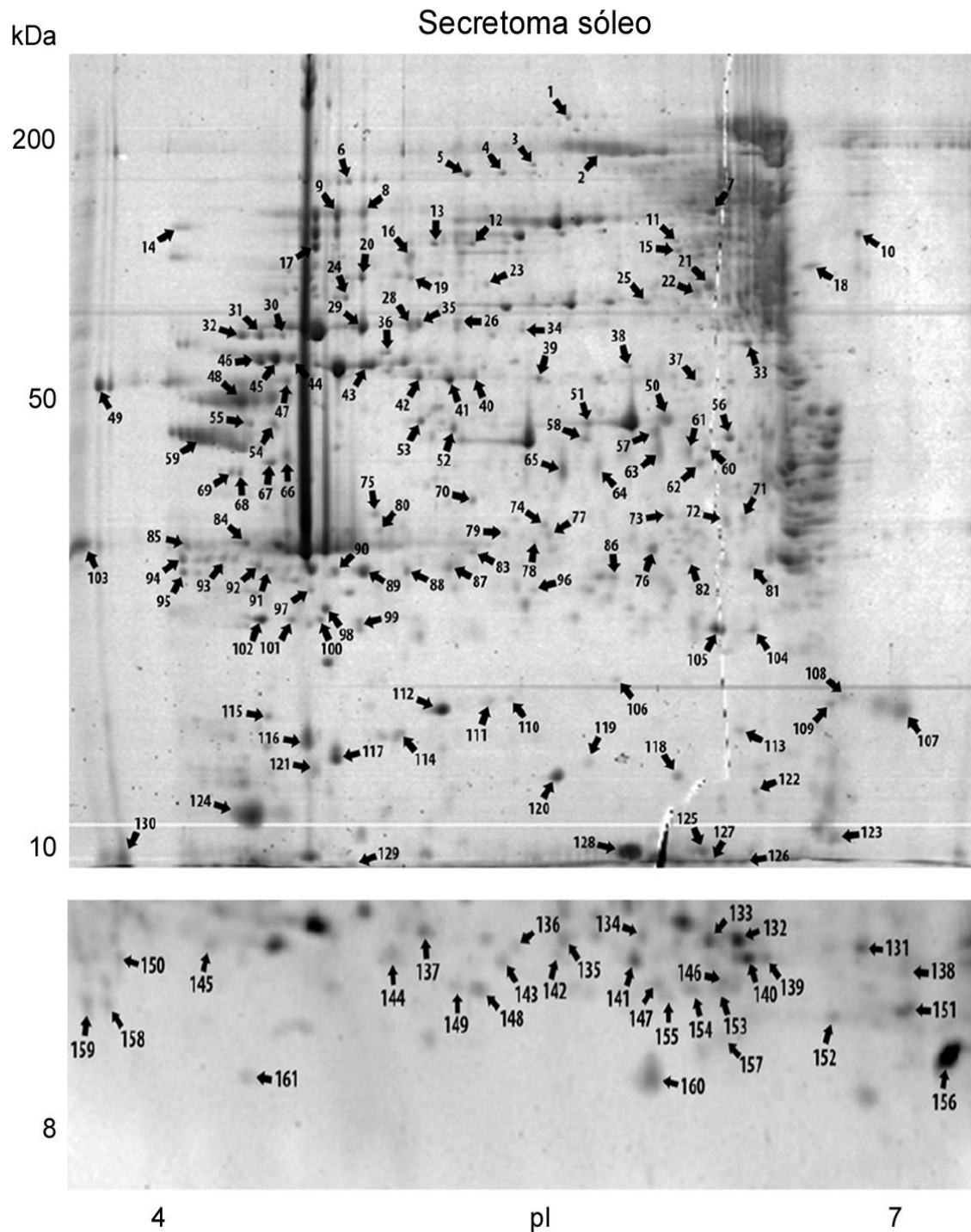
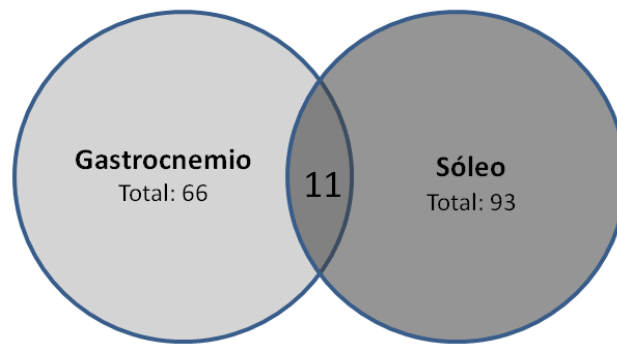


Figura 72: Mapa 2-DE de secreción del músculo sóleo. Las manchas numeradas fueron seleccionadas para su identificación por espectrometría de masas. Imagen de arriba: gel de electroforesis realizado al 10% de acrilamida/bisacrilamida; imagen de abajo: gel realizado al 15% de acrilamida/bisacrilamida.

A.



B.

	Manchas cortadas	Total proteínas únicas identificadas	Total proteínas únicas secretadas	Tipos de secreción
Gastrocnemio	200	66	34 (51.5%)	Péptido señal: 4 (6.1%) No clásica: 30 (45.5%)
Sóleo	206	93	48 (51.6%)	Péptido señal: 9 (9.7%) No clásica: 39 (42%)

Figura 73: Resumen de las proteínas identificadas en los mapas de secreción. A. Diagrama mostrando el número de proteínas comunes en los dos tipos musculares. B. Número y tipo de secreción de las proteínas identificadas en los secretomas analizados.

SecretomeP 2.0	Nombre de la proteína	Código Uniprot
0.533	Alpha-enolase	ENOA_RAT
0.555	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	SODM_RAT
0.566	Fatty acid-binding protein, heart	FABPH_RAT
0.568	L-lactate dehydrogenase B chain	LDHB_RAT
0.598	Peroxiredoxin-1	PRDX1_RAT
0.602	Myotilin	MYOTI_MOUSE
0.619	Myosin light chain 3, skeletal muscle isoform	MLE3_RAT
0.619	Phosphoglycerate mutase 2	PGAM2_RAT
0.665	Desmin	DESM_RAT
0.669	Troponin C, skeletal muscle	TNNC2_MOUSE
SignalP	Serotransferrin	TRFE_RAT

Tabla 20: Proteínas secretadas identificadas comunes a los dos tipos musculares ordenadas según el índice otorgado por el software SecretomeP. SignalP: la proteína contiene péptido señal.

4.3 Estudio diferencial entre los secretomas del tejido muscular esquelético glicolítico-rápido y oxidativo-lento bajo condiciones *ad libitum*.

Se seleccionaron imágenes representativas de geles 2-DE teñidos con una tinción fluorescente procedentes de experimentos de secreción independientes (n=4 por tipo muscular) para realizar un análisis comparativo mediante el uso de un software de análisis diferencial. De esta forma se compararon en primer lugar los secretomas de los dos tipos de tejido muscular esquelético bajo condiciones *ad libitum* (figura 74).

El análisis de componentes principales (PCA) comparando los patrones de las manchas en los geles 2-DE de los secretomas de ambos tipos musculares, mostraron una baja variabilidad entre los secretomas del mismo grupo; de la misma manera, este análisis confirmó que los secretomas de sóleo y gastrocnemio difieren mucho entre ellos (figura 74C).

A partir de una media de $746 \pm SD 4.6$ manchas en gastrocnemio y $747 \pm SD 0.5$ manchas en sóleo, se encontraron 66 diferencias estadísticamente significativas (Anova $p < 0.001$ y cambios en los niveles de expresión de al menos 2 veces/“fold change > 2”) comparando ambos secretomas (figura 74D). Mediante el análisis por espectrometría de masas se identificaron 40 proteínas diferentes, siendo clasificadas el 47.5 % como secretadas (tabla 21) (apéndice, tabla suplementaria 7). Entre ellas, 8 proteínas se encontraron elevadas en el secretoma de gastrocnemio y 11 en el sóleo. Cuatro proteínas fueron asignadas a la vía clásica de secreción predicha por la presencia de un péptido señal: la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, elevada en el secretoma de gastrocnemio; y la proteína disulfuro isomerasa, lisozima C-1 y aspartato aminotransferasa, elevadas en sóleo. Otras proteínas de interés ,secretadas por la vía no clásica, fueron la proteína DJ-1, elevada en el secretoma de gastrocnemio; el tipo muscular de la proteína de unión a ácidos grasos (FABP-3), la aspartato aminotransferasa o la proteína de unión a fosfatidiletanolamina, ambas elevadas en el secretoma de sóleo.

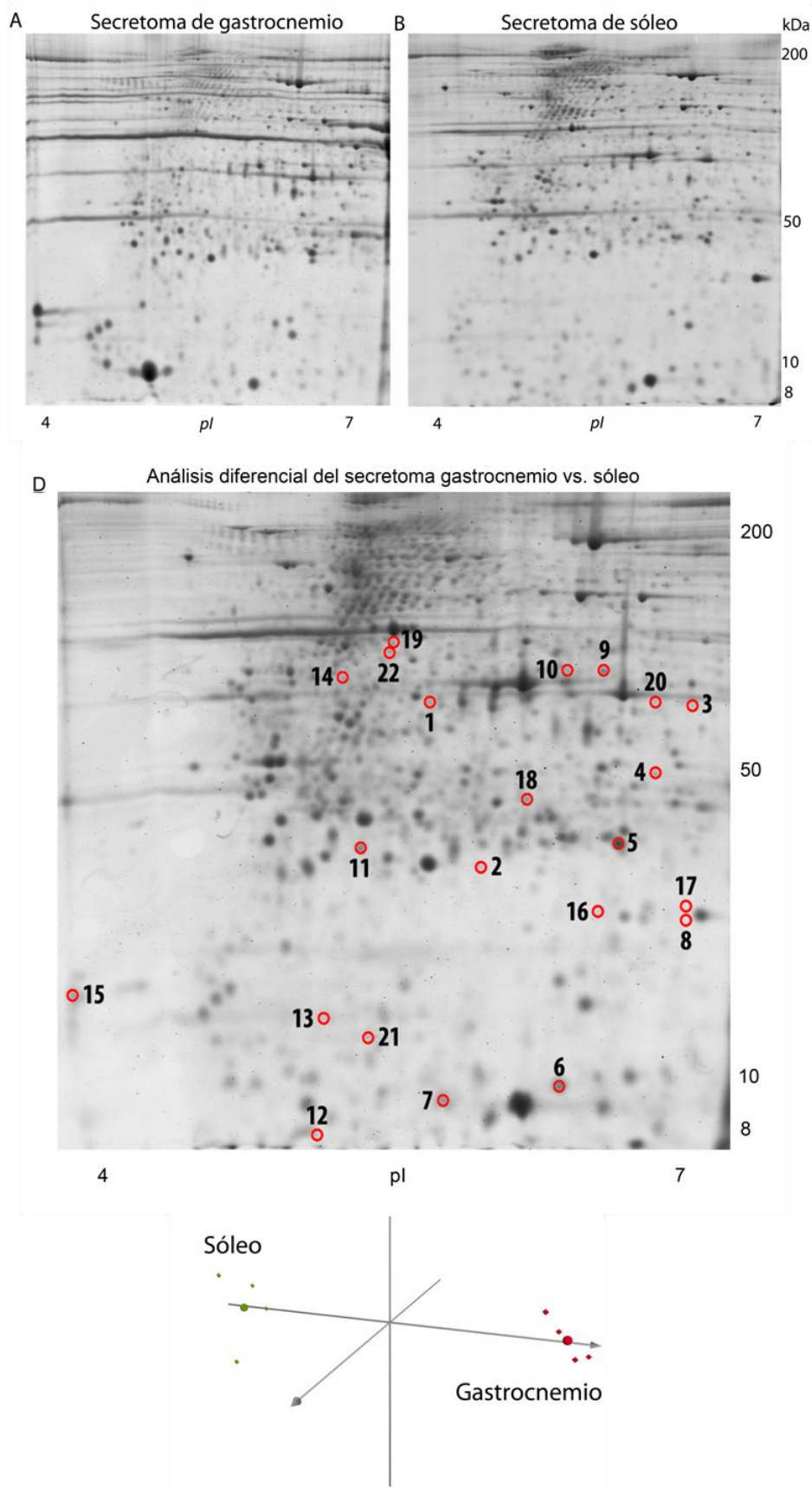


Figura 74: Análisis diferencial secretoma gastrocnemio vs. sóleo. A y B. Imágenes representativas 2-DE de secretomas procedentes de explantes de gastrocnemio y sóleo; C. Análisis PCA; D. Localización de las manchas secretadas diferencialmente.

Número de mancha	Secretome P2.0	Nombre de la proteína	Código Uniprot	Anova
1	0.504	Actin, alpha skeletal muscle	ACTS_RAT	8.796e-4
2	0.528	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	PEBP1_RAT	7.667e-4
3, 4	0.533	Alpha-enolase	ENOA_RAT	<1e-7/4.396e-6
5	0.537	Protein DJ-1	PARK7_RAT	9.004e-6
6	0.554	Profilin-2	PROF2_RAT	1.307e-4
7	0.566	Fatty acid-binding protein, heart	FABPH_RAT	1.011e-4
8	0.583	Keratin, type I cytoskeletal 42	K1C42_RAT	2.013e-4
9, 10, 3, 4	0.598	Gamma-enolase	ENOG_RAT	1.814e-4/3.559e-4/<1e-7/4.396e-6
11	0.619	Myosin light chain 1/3, skeletal muscle isoform	MYL1_RAT	1.621e-5
12	0.625	Nuclear transport factor 2	NTF2_RAT	9.436e-4
13	0.645	Myoglobin	MYG_RAT	4.766e-5
14	0.665	Desmin	DESM_RAT	2.127e-5
15	0.669	Troponin C, skeletal muscle	TNNC2_MOUSE	5.810e-4
16, 8, 17	0.886	Alpha-crystallin B chain	CRYAB_RAT	<1e-7/2.013e-4/6.567e-4
18	0.888	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial	ECHM_RAT	3.589e-4
19	Péptido señal	Aspartate aminotransferase, mitochondrial	AATM_RAT	9.545e-4
21	Péptido señal	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase	GPDA_RAT	8.198e-4/<1e-7
22	Péptido señal	Lysozyme C-1	LYZ1_MOUSE	9.930e-4
20, 3	Péptido señal	Protein disulfide-isomerase	PDIA1_RAT	8.952e-5

Sóleo**Gastrocnemio**

Tabla 21: Identificaciones de las proteínas secretadas de forma diferencial en el análisis del secretoma Gastrocnemio vs Sóleo en condiciones *ad libitum*. En blanco se muestran las proteínas sobreexpresadas en gastrocnemio, y en gris las proteínas sobreexpresadas en sóleo.

4.4 Estudio del efecto del ejercicio en los secretomas del tejido muscular gucolítico-rápido y oxidativo-lento.

Para identificar las mioquinas secretadas tras la intervención con ejercicio se recogieron secretomas de los músculos sóleo y gastrocnemio procedentes de ratas sometidas a una semana de ejercicio voluntario y se compararon con los secretomas de los mismos músculos en condiciones *ad libitum* sin ejercicio.

El análisis de PCA, al igual que en anterior análisis (figura 74C), muestra una clara diferencia entre grupos, sin embargo en este caso se observa cierto grado de dispersión dentro del mismo grupo experimental (figura 75A y 75B).

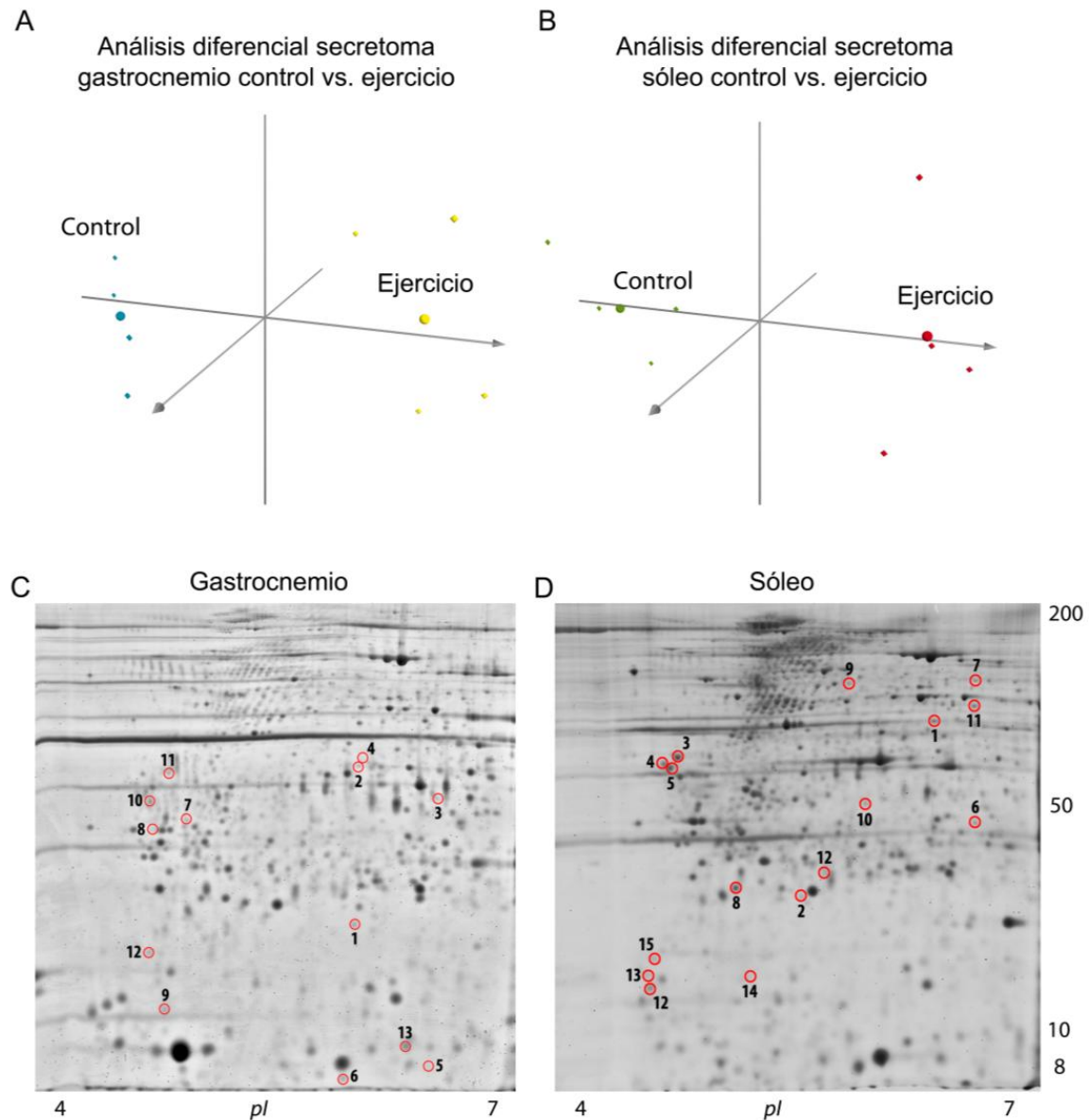


Figura 75: Análisis diferencial control vs. ejercicio en ambos tipos musculares. A y B. Análisis de PCA; C y D. Localización de las manchas diferencialmente expresadas en el análisis diferencial de gastrocnemio control frente a ejercicio y sóleo control frente a ejercicio respectivamente.

El análisis diferencial 2-DE de los secretomas tras el ejercicio comparados con los secretomas procedentes de animales control, permitió la identificación de 29 diferencias en gastrocnemio (Anova $p < 0.01$ y cambios en los niveles de expresión de al menos 2 veces/“fold change > 2 ”) y 41 diferencias en sóleo (Anova $p < 0.01$ y cambios en los niveles de expresión de al menos 2 veces/“fold change > 2 ”) (figuras 75C y 75D). De estas diferencias se identificaron 17 y 33 proteínas para gastrocnemio y sóleo respectivamente, siendo el 58.8 % y el 51.5% clasificadas como secretadas (tablas 22 y 23) (apéndice, tablas suplementarias 8, 9).

Número de mancha	Secretome P2.0	Nombre de la proteína	Código Uniprot	Anova
1	0.504	Actin, alpha cardiac muscle 1	ACTC_RAT	0.0089
2	0.533	Alpha-enolase	ENOA_RAT	7.629e-4
3	0.533	Alpha-enolase	ENOA_RAT	0.0097
4	0.551	N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1	DDAH1_RAT	1.325e-4
5	0.560	Keratin, type I cuticular Ha5	KRT35_MOUSE	0.0012
6	0.566	Fatty acid-binding protein, heart	FABPH_RAT	0.0011
2	0.598	Gamma-enolase	ENOG_RAT	7.629e-4
7	0.620	Enolase-phosphatase E1	ENOPH_RAT	0.0049
8, 9, 10	0.624	Tropomyosin alpha-1 chain	TPM1_RAT	0.0039/0.0067/ 0.0018
11, 12	0.684	Desmin	DESM_MOUSE	0.0068/0.0017
13	Péptido señal	Transthyretin	TTHY_RAT	4.553e-6

Control

Ejercicio

Tabla 22: Identificaciones de las proteínas secretadas tras el análisis diferencial del secretoma gastrocnemio control vs. ejercicio. En gris se muestran las proteínas sobreexpresadas en ejercicio, y en blanco las proteínas sobreexpresadas en los animales control.

Número de mancha	Secretome P2.0	Nombre de la proteína	Código Uniprot	Anova
1	0.504	Actin, alpha skeletal muscle	ACTS_RAT	9.794e-4
2	0.504	Actin, alpha cardiac muscle 1	ACTC_RAT	0.0034
3, 4, 5	0.518	Tropomyosin beta chain	TPM2_RAT	0.0044/5.389e-4/0.0055
2	0.528	Phosphatidylethanolamine-binding protein	PEBP1_RAT	0.0034
6	0.533	Alpha-enolase	ENOA_RAT	2.883e-4
7	0.540	Selenium-binding protein 1	SBP1_RAT	0.0024
8	0.579	Proteasome subunit beta type-6	PSB6_RAT	2.286e-5
9	0.580	V-type proton ATPase subunit B, brain isoform	VATB2_RAT	8.448e-4
6	0.598	Gamma-enolase	ENOG_RAT	2.883e-4
10	0.606	N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2	DDAH2_RAT	0.0061
3, 5	0.624	Tropomyosin alpha-1 chain	TPM1_RAT	0.0044/0.0055
11	0.634	Isovaleryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	IVD_RAT	9.247e-5
12	0.657	Abhydrolase domain-containing protein 14B	ABHEB_RAT	6.701e-4
13	0.803	Nucleophosmin	NPM_RAT	4.351e-4
14	0.858	Calpain small subunit 1	CPNS1_RAT	0.0023
15	0.859	60S ribosomal protein L12	RL12_RAT	0.0099
1	Péptido señal	Fibrinogen beta chain	FIBB_RAT	9.794e-4

Control**Ejercicio**

Tabla 23: Identificaciones de las proteínas secretadas tras el análisis diferencial de gastrocnemio control vs. ejercicio. En gris se muestran las proteínas sobreexpresadas en ejercicio, y en blanco las proteínas sobreexpresadas en los animales control.

Los análisis diferenciales para ambos tipos musculares mostraron algunas proteínas comunes entre ellos, como la alfa y gamma enolasa y la N(G)-dimetilarginina dimetilaminohidrolasa 2, más abundantes en los secretomas control tanto de gastrocnemio como de sóleo; y la cadena alfa-1 de la tropomiosina, que se encontró más elevada en los secretomas de ejercicio para ambos tejidos (tablas 22 y 23).

De todas las proteínas identificadas, basándose en la bibliografía, se seleccionaron la proteína DJ-1 implicada en el estrés oxidativo y muerte celular y la FABP-3 que juega un papel importante en el transporte intracelular de cadenas largas de ácidos grasos. La expresión de ambas proteínas se analizó mediante inmunodetección con anticuerpos específicos confirmándose los resultados del análisis diferencial (figura 76). Se comprobó que la proteína DJ-1 es secretada en mayor proporción por el gastrocnemio, mientras que en el sóleo durante el ejercicio, sus niveles de secreción se encuentran más elevados que en el control (figura 76A). Con respecto a la FABP-3 se confirmó que el sóleo es el tejido que muestra los niveles más elevados (figura 76B).

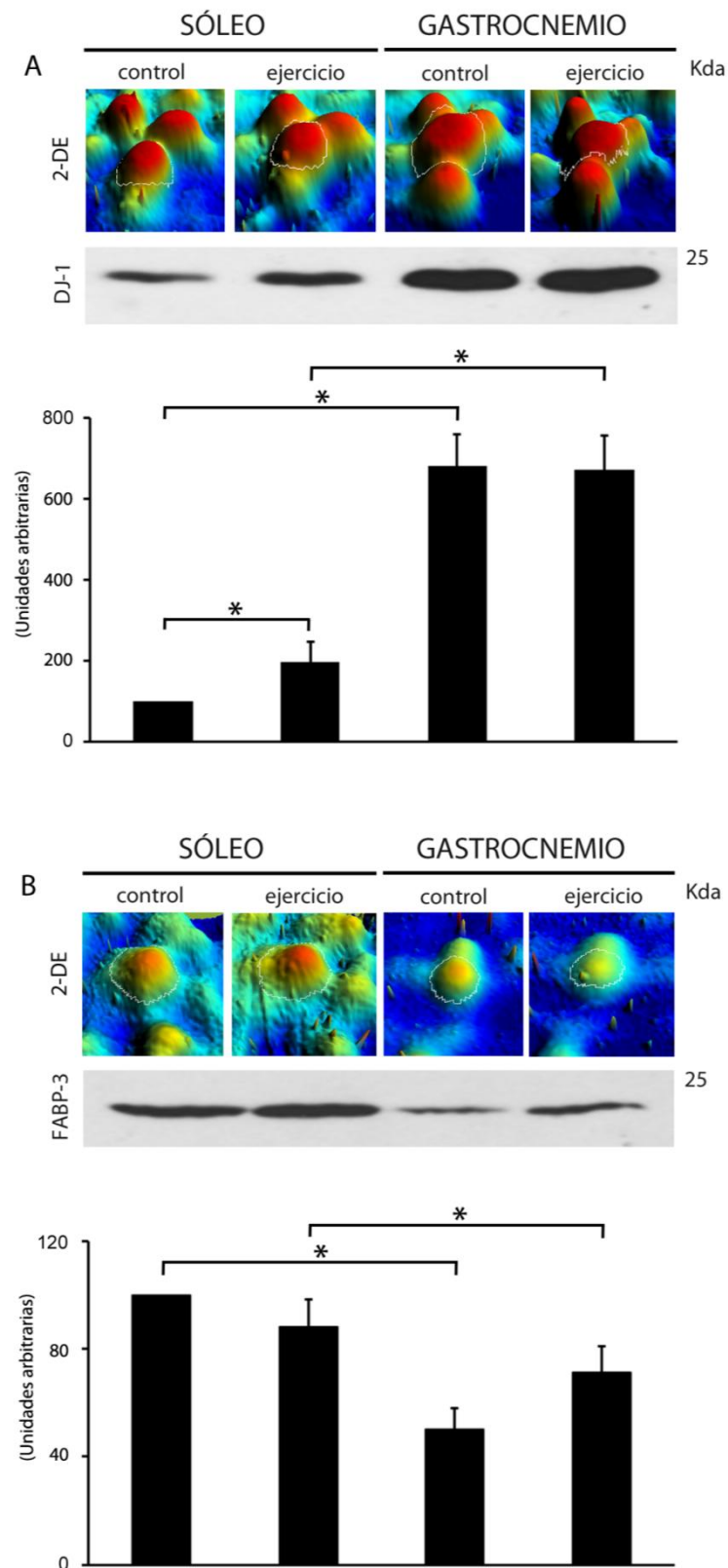


Figura 76: Validación por inmunodetección de las proteínas DJ-1 y FABP-3. A y B. Se muestran imágenes representativas de la mancha perteneciente a DJ-1 o FABP-3 en los geles 2-DE tras el análisis diferencial, y de las bandas tras la inmunodetección con anticuerpos específicos. También se muestran los histogramas con los valores de la densitometrías en porcentaje. Las diferencias significativas se indican como * $p < 0.05$.

5. Caracterización de la hormona FNDC5/irisina.

Hace poco más de un año, se identificó la proteína FNDC5/irisina como una mioquina secretada por el tejido muscular esquelético en respuesta al ejercicio mediada por la activación del cofactor de transcripción PGC-1 α . Se demostró que esta proteína era capaz de iniciar un fenómeno que se denominó *browning* mediante el cual algunas células del TA blanco adquirirían un fenotipo similar al de los adipocitos marrones. También se sugirió, tras varios experimentos realizados por el grupo descubridor, que la irisina podría mejorar la obesidad y la sensibilidad a insulina [77].

A falta de un mayor conocimiento sobre esta proteína, se consideró oportuno realizar una caracterización completa de la secreción de irisina en el tejido muscular esquelético, bajo diferentes condiciones fisiológicas y patológicas de los modelos animales anteriormente descritos.

5.1 FNDC5/irisina como mioquina.

5.1.1 Validación de las muestras para su análisis e identificación de la banda de inmunodetección perteneciente a FNDC5/irisina

Se recogieron muestras de tejido muscular de rata para analizar la expresión y secreción de FNDC5/irisina. Para confirmar la viabilidad y naturaleza de los secretomas recogidos, se ensayó la secreción de la mioquina conocida IL-6 como referencia (figura 77A). Como se esperaba, tanto en gastrocnemio como en sóleo se observó secreción de IL-6, incrementándose significativamente tras tres semanas de ejercicio [132]. El siguiente paso fue comprobar la expresión de PGC1- α en estos tejidos tras una o tres semanas de ejercicio voluntario mediante qRT-PCR. Al contrario de lo esperado no pudieron observarse diferencias significativas entre ambos tipos musculares (figura 77A).

Una vez caracterizados los secretomas, se analizaron los niveles secretados de FNDC5/irisina por inmunodetección en las mismas muestras de secretoma que se mencionan arriba. Como el peso molecular de la forma secretada de FNDC5/irisina todavía no está bien caracterizado y existe controversia, se analizaron los secretomas de tejido muscular con un anticuerpo dirigido hacia la forma teóricamente no secretada de la proteína (FNDC5, aminoácidos 149-178) (figura 77B), y con otro anticuerpo dirigido específicamente hacia la región que teóricamente se secreta al escindir en un péptido de unos 12 kDa (irisina, aminoácidos 42-112) (figura 77C).

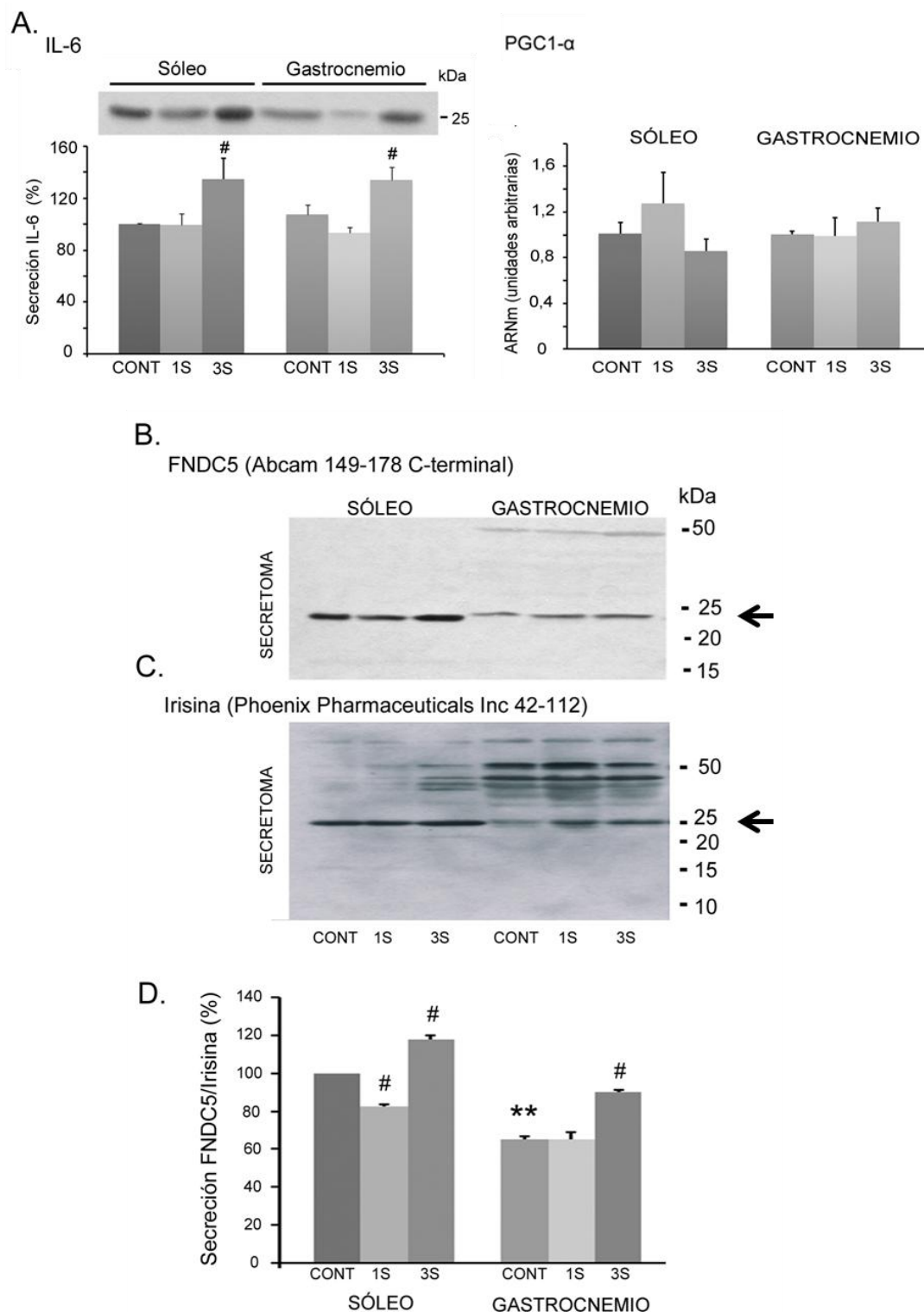


Figura 77: Validación de los secretomas de tejido muscular y caracterización de la secreción de FNDC5/irisina. A. Inmunodetección de IL-6 y expresión de PGC1alpha tras 1 o 3 semanas (1S o 3S) de ejercicio; B. Imágenes representativas de la inmunodetección de FNDC5/irisina utilizando un anticuerpo frente a la forma larga FNDC5; C. Inmunodetección contra la forma corta teórica de irisina. D. Diferencias en la secreción de FNDC5/irisina tras 1 o 3 semanas de ejercicio en ambos tipos musculares. Las diferencias significativas se indican como $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ frente al control de sóleo; y $\#p < 0.05$ frente a su propio control. CONT: control; 1S: ejercicio 1 semana; 3S: ejercicio 3 semanas.

Al observar las imágenes completas de inmunodetección, se pudo comprobar la existencia de una banda predominante a 25 kDa en los secretomas de músculo con ambos anticuerpos. Sorprendentemente, fue imposible detectar una señal fuerte de la banda de 12 kDa cuando se usó el anticuerpo frente a la forma soluble irisina (figura 77C). Sin embargo, este anticuerpo detectó una banda fuertemente marcada para la proteína total de 25 kDa con unos patrones de secreción idénticos a los obtenidos en la inmunodetección para el anticuerpo frente a FNDC5 (indicado con flechas en las figuras 77B y 77C). Por otro lado, ambos anticuerpos fueron capaces de detectar bandas extra de diferentes intensidades y pesos moleculares. Tras este experimento la banda que se consideró para su análisis fue la de 25 kDa, confirmando además que los dos anticuerpos usados para las mismas muestras presentaron resultados similares.

5. 1.2 La secreción y expresión de FNDC5/irisina en el tejido muscular esquelético se ve afectada por la restricción calórica y por el ejercicio.

5.1.2.1 Secreción de FNDC5/irisina

Se densitometraron 5 experimentos independientes y se expresaron en porcentaje tomando como referencia la banda de 25 kDa del secretoma de sóleo. Así, se pudo determinar que el músculo sóleo secreta un 40% más de FNDC5/irisina que el gastrocnemio en condiciones basales (figura 78A), apareciendo el pico de mayor secreción en ambos tejidos a las 3 semanas de someter a los animales a ejercicio voluntario (figura 78B).

El estudio del efecto del ayuno (36 horas) sobre los dos tipos de tejidos musculares mostró efectos inversos entre ellos; mientras que en el sóleo aumentaba la secreción de FNDC5/irisina, en el gastrocnemio esta se vio reducida. De todas formas, en ambos tejidos se incrementó significativamente la secreción de FNDC5/irisina tras 15 minutos de alimentación después del ayuno de 36 horas (figura 78C).

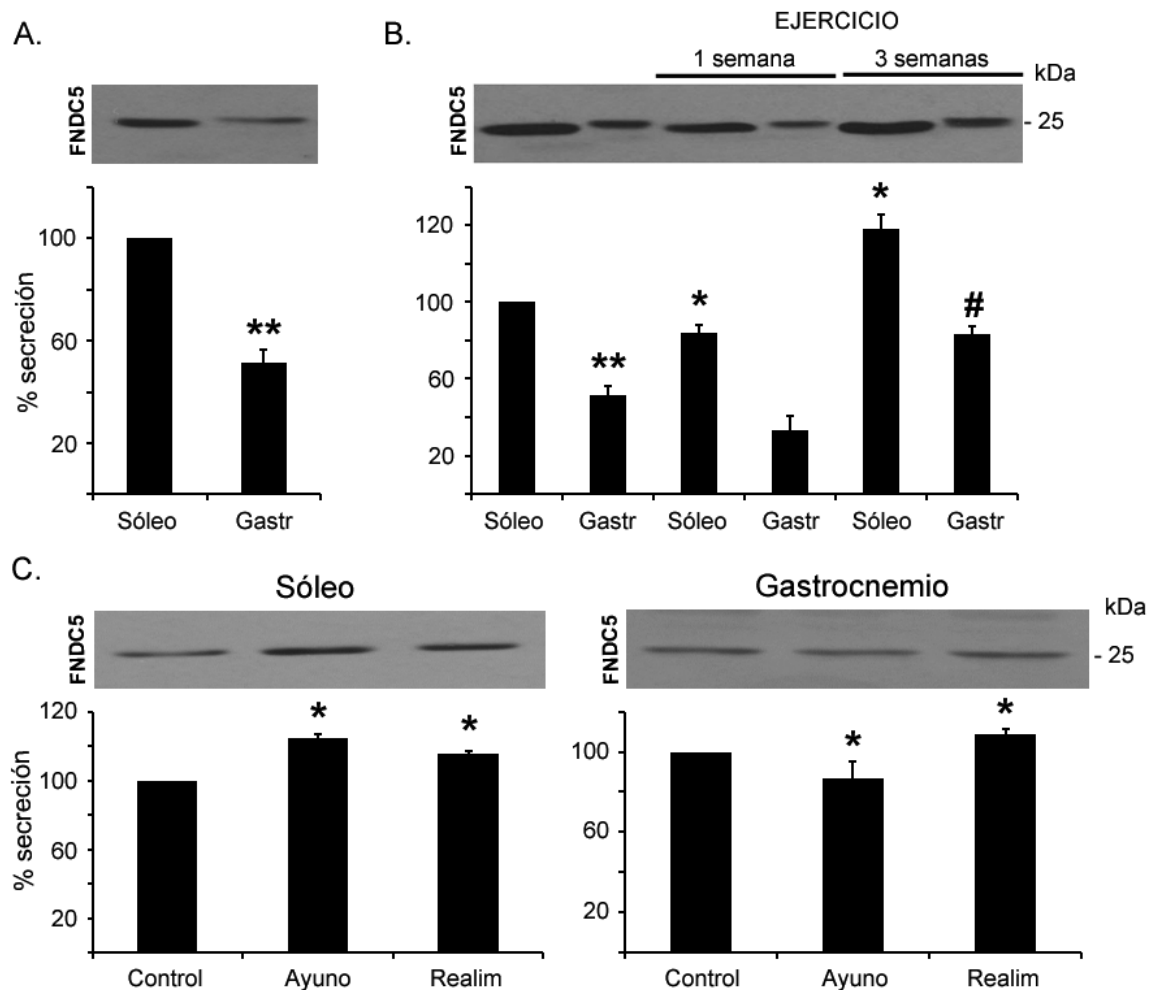


Figura 78: Análisis de la secreción de FNDC5/irisina en el tejido muscular en distintos modelos fisiológicos. A. Imagen representativa e histogramas de la densitometría de la secreción de FNDC5/irisina en sóleo vs. gastrocnemio en condiciones basales ad libitum; B. Afectación de la secreción tras la intervención con 1 o 3 semanas de ejercicio en ambos tejidos; C. Efecto del ayuno y realimentación sobre la secreción de FNDC5/irisina. Las diferencias significativas se indican como * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ frente al control de sóleo; y # $p < 0.05$ frente al control de gastrocnemio. Gastr: gastrocnemio; Realim: realimentación.

5.1.2.2 Expresión de FNDC5 intracelular y ARNm

A nivel intracelular, al igual que en la secreción, los niveles de FNDC5 observados en sóleo fueron mucho mayores que en gastrocnemio en condiciones basales, manteniéndose esta diferencia proporcionalmente en todos los modelos ensayados (figura 79). La proteína intracelular en el sóleo varía en función del ejercicio de una manera similar a lo visto en su secreción aunque de forma menos marcada, sin embargo en el gastrocnemio no se aprecian diferencias (figura 79A). En ambos tejidos, la realimentación de 15 minutos tras 36 horas de ayuno indujo un gran aumento en la expresión de FNDC5 (figura 79B).

Con respecto a los niveles de ARNm, no se observaron diferencias de expresión entre ambos tejidos tanto a niveles basales como en el resto de modelos (figura 79). A nivel individual, tanto en sóleo como en gastrocnemio la expresión sufre una disminución significativa tras el ayuno, la cual se mantiene con la realimentación de 15 minutos (figura 79B).

5.1.3 La secreción y expresión de FNDC5/irisina en el tejido muscular esquelético también se encuentra alterada en situaciones patológicas.

Dado lo interesante que resulta conocer cómo se comporta la FNDC5/irisina del tejido muscular esquelético bajo diferentes situaciones patológicas, se midieron los niveles de expresión y secreción de esta proteína en modelos animales de obesidad y anorexia (ABA).

5.1.3.1 Secreción de FNDC5/irisina

Tras analizar las muestras procedentes del modelo de anorexia (ABA) junto con sus respectivos controles, se observó como la particular restricción calórica a la que se someten estos animales influyó positivamente en la secreción de FNDC5/irisina por parte del sóleo y el gastrocnemio (figuras 80A y 80B), siendo más moderado el efecto en el caso del sóleo (figura 80A). Al sumar el efecto del ejercicio, se mantuvieron niveles significativamente altos en la secreción por parte del gastrocnemio (figura 80B). Al igual que lo observado en la sección anterior, una semana de ejercicio no es suficiente para que los niveles de FNDC5/irisina se incrementen significativamente en ambos tejidos.

Con respecto a los modelos de obesidad, en las ratas Zucker se observaron patrones inversos, en sóleo la secreción de FNDC5/irisina se encuentra disminuida (figura 80C), al igual que se observó en los valores obtenidos en FNDC5/irisina circulante (figura 87); sin embargo en gastrocnemio la secreción aumenta significativamente respecto a su control (figura 80D). La obesidad inducida por la dieta por el contrario, influye positivamente en la secreción de FNDC5/irisina en sóleo (figura 80C), mientras que en gastrocnemio no se observan diferencias significativas (figura 80D).

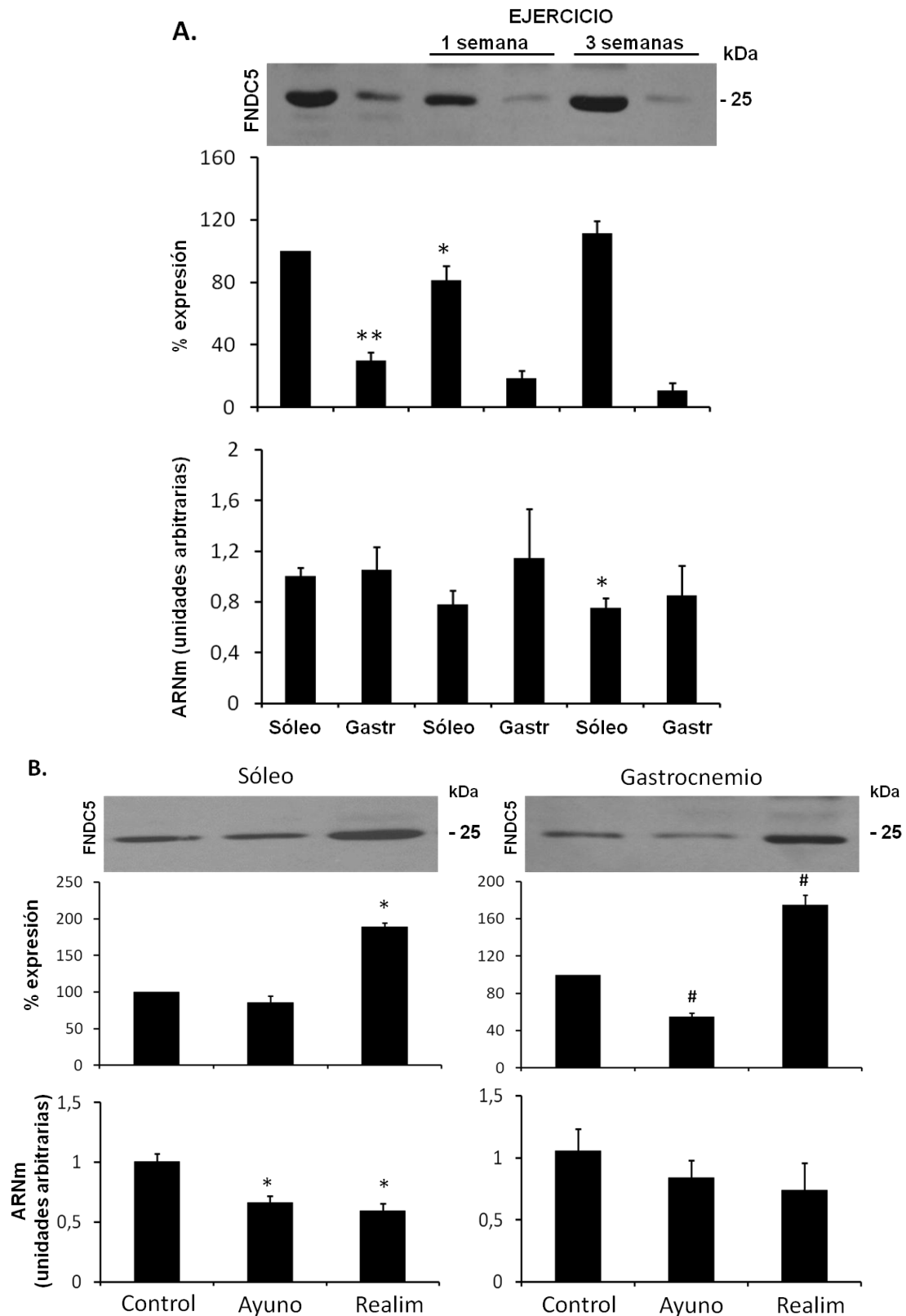


Figura 79: Análisis de la expresión del mensajero y proteína intracelular de FNDC5 en el tejido muscular en distintos modelos fisiológicos. A. Expresión proteica y mensajero de FNDC5/irisina en condiciones basales y tras 1 o 3 semanas de ejercicio. B. Afectación del ayuno y realimentación a la expresión de FNDC5/irisina en sóleo y gastrocnemio. Las diferencias significativas se indican como * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ frente al control de sóleo; y # $p < 0.05$ frente al control de gastrocnemio. Gastr: gastrocnemio; Realim: realimentación.

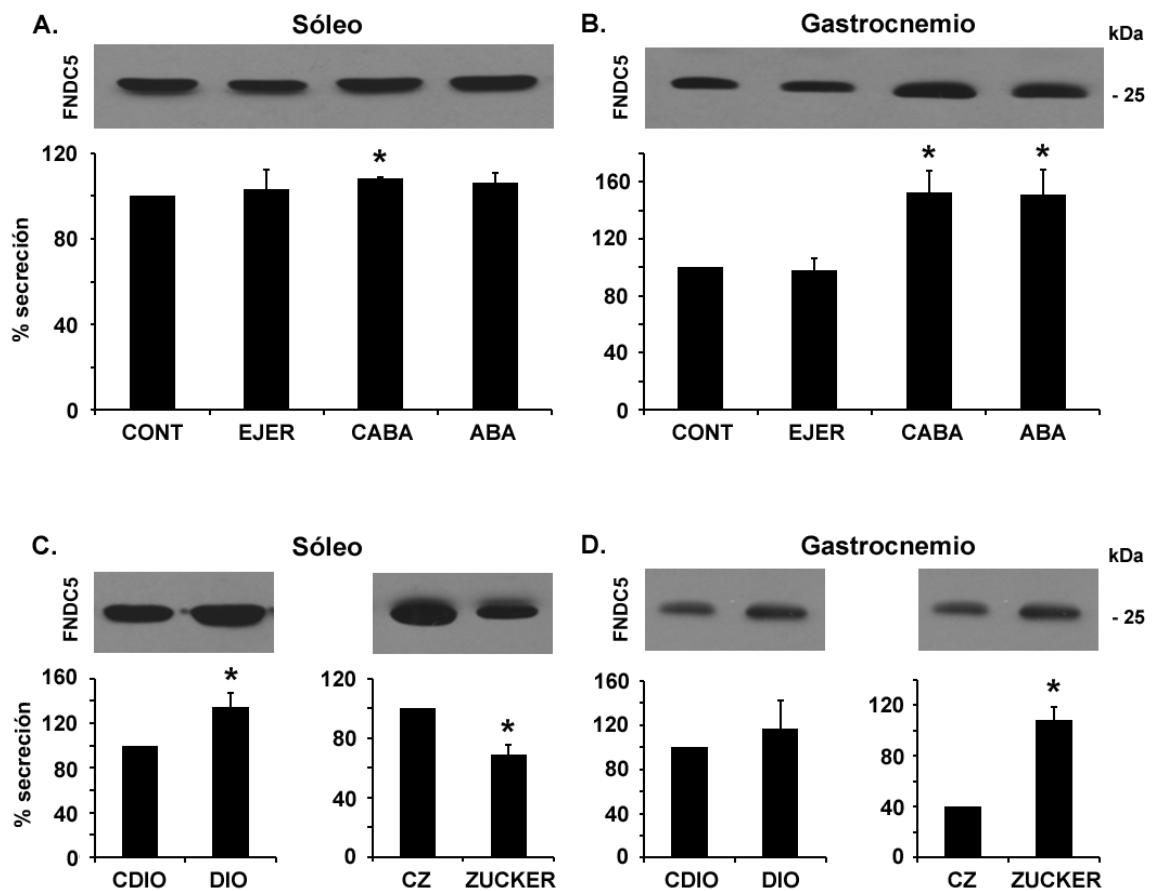


Figura 80: Análisis de la secreción de FNDC5/irisina en el tejido muscular de los distintos modelos animales. A. Imagen representativa e histograma con la densitometría de los niveles de FNDC5/irisina en el secretoma del músculo sóleo; B. Niveles de FNDC5/irisina en el secretoma del músculo gastrocnemio; C y D. Presencia de FNDC5/irisina en el secretoma del tejido muscular procedente de animales obesos. Las diferencias significativas se indican como * $p < 0.05$. CONT: control; EJER: ejercicio; CZ: control Zucker.

5.1.3.2 Expresión de FNDC5 intracelular y ARNm

En el sóleo, al igual que en los niveles secretados, se observa un incremento en los niveles de FNDC5 intracelular en los animales sometidos a la restricción calórica del modelo ABA, sin embargo sorprendentemente, al combinar dicha dieta con el ejercicio físico, estos niveles se reducen por debajo incluso de los niveles basales. En el caso del gastrocnemio, los niveles del control del modelo ABA se comportan de manera opuesta al sóleo, observándose una significativa disminución con respecto al nivel basal, sin embargo al combinar el ejercicio, estos niveles se normalizan (figura 81A).

La dieta alta en grasa del modelo DIO produce un incremento en los niveles de proteína intracelular en el gastrocnemio, mientras que en el sóleo no se observan variaciones (figura 81B). Respecto al modelo de obesidad genética, los niveles de FNDC5 en el sóleo están significativamente más bajos en los animales homocigotos, mientras que en gastrocnemio se mantienen normales (figura 81C).

En general, en todos los modelos patológicos no se observan variaciones a nivel de ARNm, sin embargo sí se produce una significativa disminución en el gastrocnemio de las ratas del modelo ABA (figura 81A).

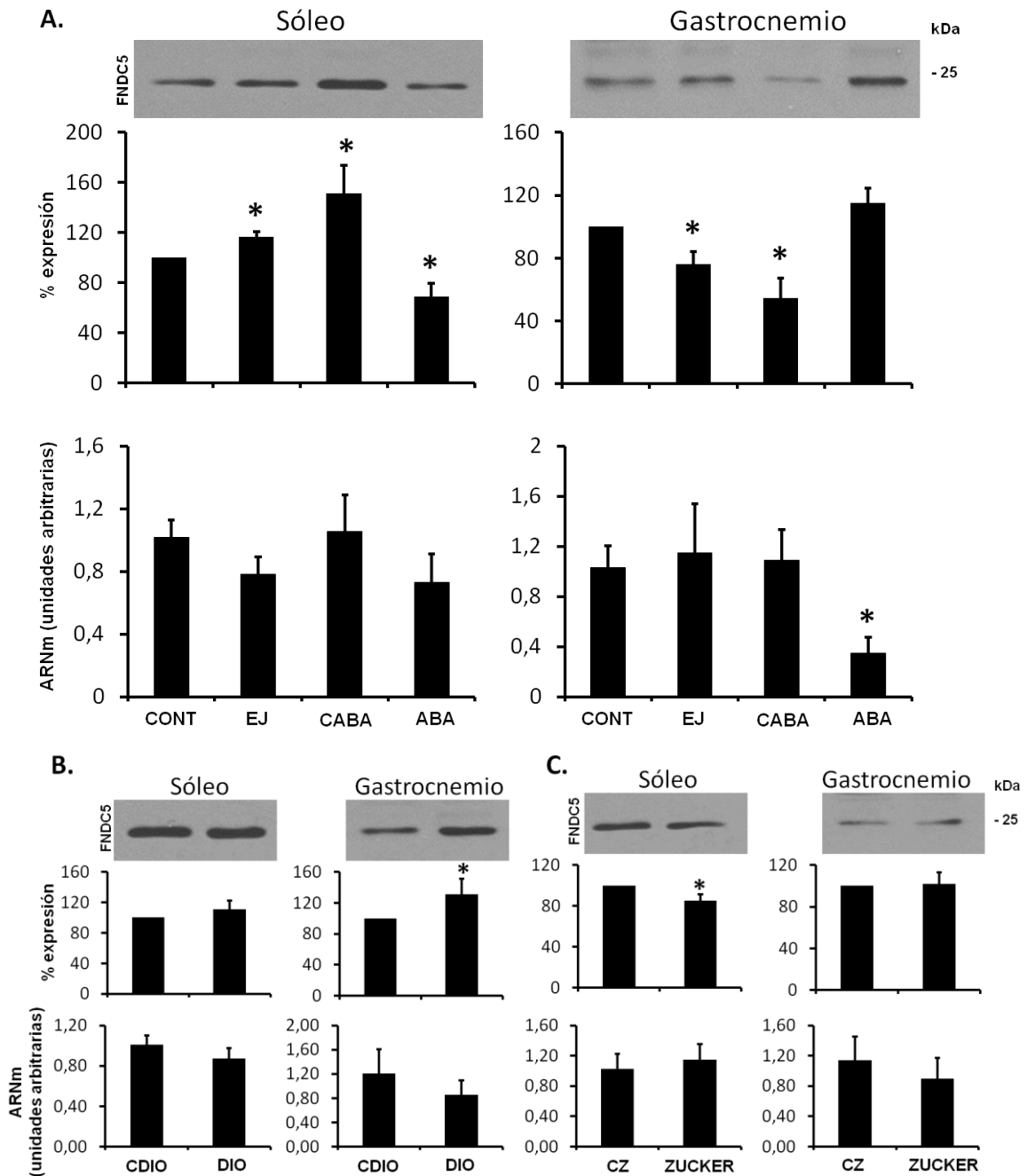


Figura 81: Análisis de la expresión del mensajero y proteína intracelular de FNDC5 en el tejido muscular en los modelos establecidos. A. Expresión de FNDC5/irisin a nivel de proteína y mensajero en el modelo ABA y sus grupos control. B. Expresión de FNDC5 en los modelos patológicos de obesidad. . Las diferencias significativas se indican como * $p < 0.05$. CONT: control; EJ: ejercicio; CZ: control Zucker.

5.2 FNDC5/irisina como adipoquina

5.2.1 El tejido adiposo blanco también secreta FNDC5/irisina.

Inesperadamente, durante el proceso de caracterización de la regulación de la mioquina FNDC5/irisina bajo diferentes situaciones nutricionales y patológicas, se descubrió que el tejido adiposo de rata era capaz de expresar y secretar esta proteína.

Ante este descubrimiento se recogieron muestras de TAVo y TAS de rata para analizar la expresión y secreción de FNDC5/irisina. Para confirmar la viabilidad y naturaleza de los secretomas se ensayó la secreción de la adipoquina conocida adiponectina como referencia (figura 82A). Como se esperaba, se detectó esta adipoquina en el secretoma de ambos tejidos y se confirmó que el TAS secretaba mayor cantidad de adiponectina que el TAVo [188], y que esta secreción se veía incrementada a una semana de ejercicio [189]. El siguiente paso fue comprobar la expresión de PGC1- α en estos tejidos tras una o tres semanas de ejercicio voluntario mediante RT-PCR. Al contrario de lo esperado no pudieron observarse diferencias significativas entre los depósitos de tejido adiposo (figura 82B). Sin embargo, una semana de ejercicio aumentó ligeramente la expresión de PGC1- α tanto en TAS como en TAVo.

Una vez caracterizados los secretomas, se analizaron los niveles secretados de FNDC5/irisina por inmunodetección en las mismas muestras de secretoma que se mencionan arriba. Siguiendo el mismo diseño experimental realizado con respecto a las muestras procedentes del músculo esquelético, se analizaron los secretomas de tejido adiposo con un anticuerpo dirigido hacia la forma teóricamente no secretada de la proteína (FNDC5, aminoácidos 149-178), y con otro anticuerpo dirigido específicamente hacia la región teóricamente secretada (irisina, aminoácidos 42-112). En las figuras 82C y 82D, en donde se muestran las imágenes completas de los inmunoblots, se pudo comprobar la existencia de una banda predominante de 25 kDa tanto en los secretomas de músculo como de tejido adiposo con ambos anticuerpos. En el tejido adiposo, al igual que lo observado anteriormente en el músculo, tampoco fue imposible detectar una señal fuerte de la banda de 12 kDa cuando se usó el anticuerpo frente a la forma soluble irisina (figura 82D). Sin embargo, este anticuerpo detectó una banda fuertemente marcada para la proteína total de 25 kDa con unos patrones de secreción idénticos a los obtenidos en los inmunoblots realizados con el anticuerpo frente a FNDC5 (indicado con flechas en las figuras 82C y 82D). Por otro lado, ambos anticuerpos fueron capaces de detectar bandas extra de diferentes intensidades y pesos moleculares.

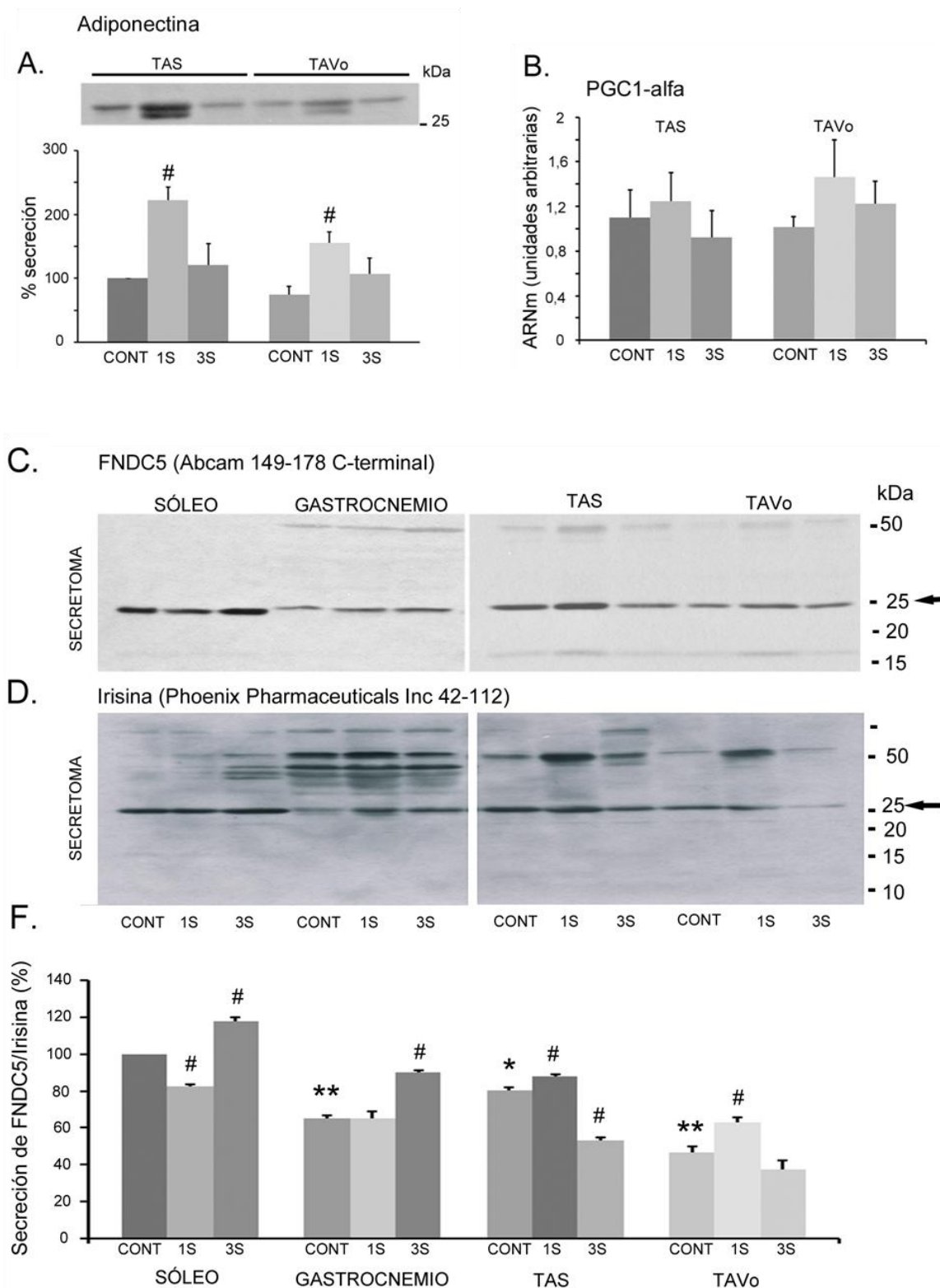


Figura 82: Validación de los secretomas de tejido adiposo y caracterización de la secreción de FNDC5/irisina. A. Inmunodetección de adiponectina; B. Expresión de PGC1alpha tras 1 o 3 semanas (1S o 3S) de ejercicio; C. Imágenes representativas de la inmunodetección de FNDC5/irisina en tejido muscular y adiposo utilizando un anticuerpo frente a la forma larga FNDC5; D. Inmunodetección contra la forma corta teórica de irisina; F. Diferencias en la secreción de FNDC5/irisina tras 1 o 3 semanas de ejercicio en ambos tipos tisulares. Las diferencias significativas se indican como * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ frente al control de sóleo; y # $p < 0.05$ frente a su propio control. CONT: control; 1S: ejercicio 1 semana; 3S: ejercicio 3 semanas.

5.2.2 La secreción y expresión de FNDC5/irisina en el tejido adiposo está modulada por el ejercicio y el estado nutricional.

En vista de los interesantes hallazgos que relacionaron el tejido adiposo con la FNDC5/irisina, se decidió a realizar una mejor caracterización de la expresión y secreción de esta proteína en tejido adiposo bajo diferentes situaciones nutricionales y patológicas al igual que se hizo en la caracterización del tejido muscular esquelético.

5.2.2.1 Secreción de FNDC5/irisina

Se densitometraron 5 experimentos independientes y se expresaron en porcentaje tomando como referencia la banda de 25 kDa del secretoma de sóleo. Así, pudimos determinar que bajo condiciones basales, el sóleo secreta aproximadamente un 40 % más FNDC5/irisina que el gastrocnemio, un 20 % más que el TAS, y aproximadamente un 60 % más que el TAVo (figura 82F). Sin embargo, tanto el TAS como el TAVo mostraron un incremento en la secreción con tan sólo una semana de ejercicio, al contrario del tejido muscular, en donde este aumento se producía tan sólo a partir de la tercera semana (figura 82F y 83B).

Cuando se comparó el tejido adiposo de diferentes localizaciones anatómicas, se observó que el TAS secretaba un 40 % más de FNDC5/irisina que el TAVo; sin embargo, el TAP apenas secretaba esta proteína en comparación con el tejido adiposo blanco bajo condiciones *ad libitum* (figura 83A). De manera adicional, también se demostró que una semana de ejercicio voluntario incrementaba significativamente la secreción de FNDC5/irisina por parte del TAS (46 %) y del TAVo (36 %); sin embargo, tras largo periodos de entrenamiento (3 semanas), la secreción de FNDC5/irisina disminuyó en ambos tejidos significativamente comparada con los controles sin ejercicio (figura 83B). También se observó que el ayuno (36 horas) producía una disminución significativa en la secreción de esta proteína tanto para el TAS como para el TAVo (figura 83C); este efecto se revertió en la secreción en ambos tejidos tras alimentar a los animales 15 minutos tras el ayuno. Finalmente, la secreción de FNDC5/irisina en TAP no se vio afectada por el ayuno.

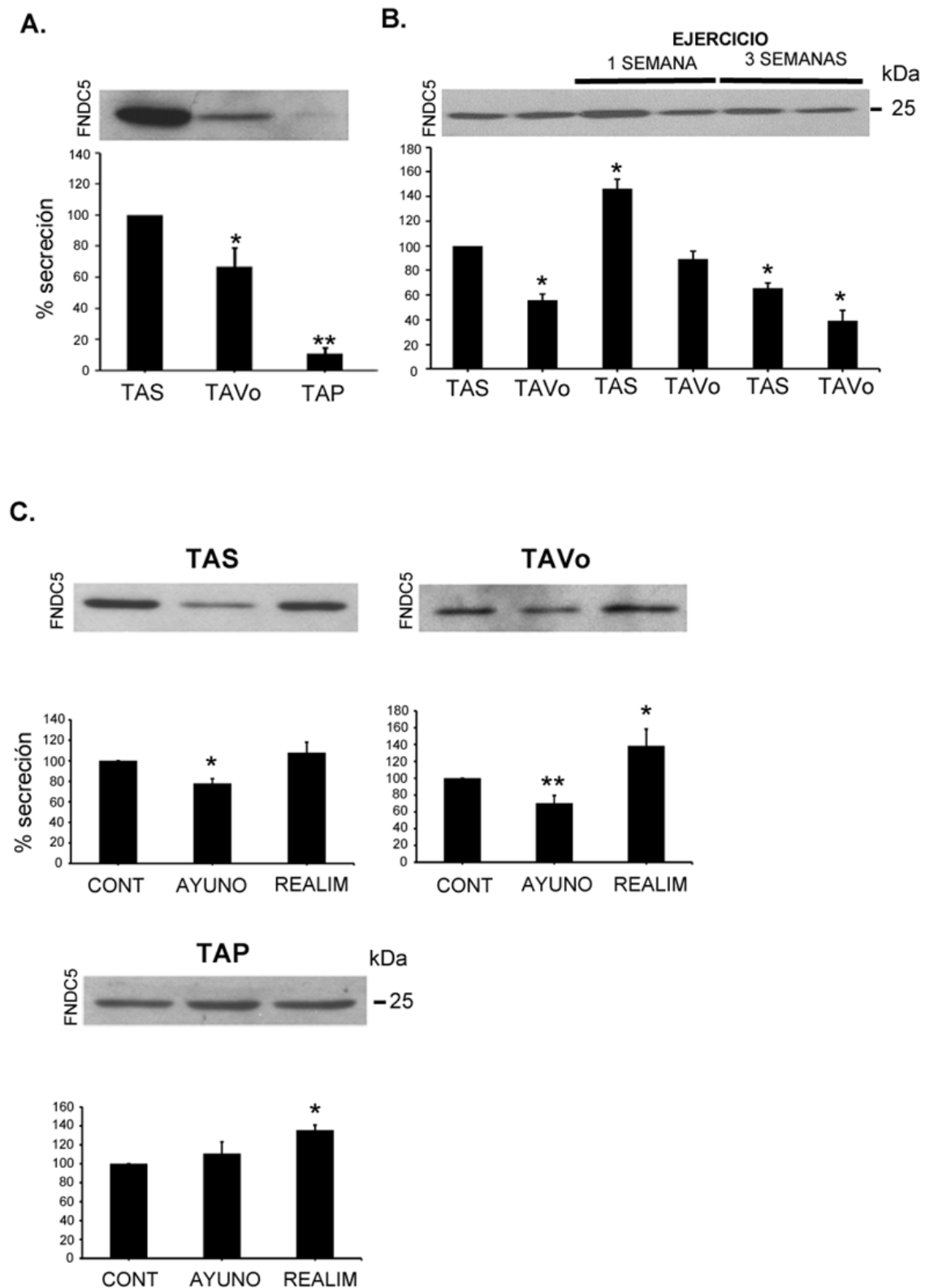


Figura 83: Análisis de la secreción de FNDC5/irisina en TAS, TAVo y TAP en los distintos modelos fisiológicos. A. Niveles de FNDC5/irisina en los secretomas de TAS, TAVo y TAP en condiciones basales; B. Secreción en los tres tipos de tejido tras 1 o 3 semanas de ejercicio; C. Variaciones de secreción tras ayuno y realimentación. Las diferencias significativas se indican como * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. CONT: control; REALIM: realimentación.

5.2.2.2 Expresión de FNDC5 intracelular y ARNm

Al comprobar los niveles de proteína intracelular de FNDC5 en estos modelos, se comprobó que se mantenía la distribución observada en la secreción a niveles basales por parte de los tres tipos de TA, sin embargo a nivel del mensajero no se apreciaron variaciones (figura 84A). El ejercicio produjo un incremento en los niveles de FNDC5 del sóleo tanto a una como a tres semanas, sin embargo en el gastrocnemio, el cual también posee niveles elevados a 3 semanas de ejercicio, se produce una significativa disminución a una semana (figura 84B). Con respecto a su mensajero, a una semana de ejercicio se aprecia un ligero incremento en ambos tejidos, valores que vuelven a los niveles basales tras 3 semanas.

Con respecto al ayuno, se observó una disminución significativa en los niveles de FNDC5 intracelular del TAS y el TAVo, niveles que no son capaces de recuperarse tras la realimentación de 15 minutos (figura 84C), el efecto de la realimentación también se observa para el TAP. Con respecto a los valores de ARNm no se aprecian variaciones durante el ayuno o la realimentación, sin embargo en el TAP parece que estos disminuyen ligeramente.

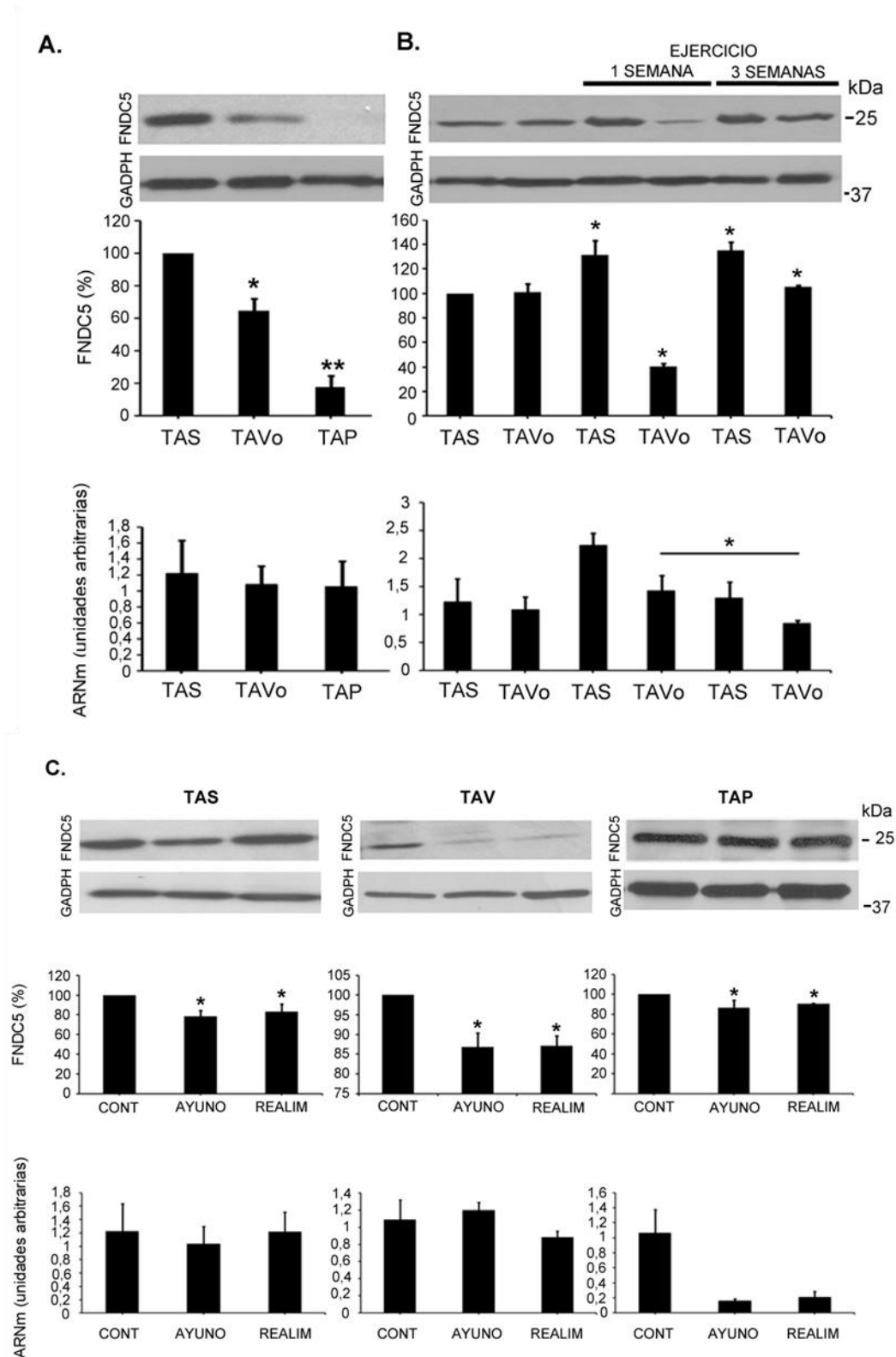


Figura 84: Análisis de la expresión del mensajero y proteína intracelular de FND5 en TAS, TAVo y TAP en los distintos modelos fisiológicos. A. Niveles de expresión FND5/irisina en TAS, TAVo y TAP en condiciones basales; B. Expresión en los tres tipos de tejido tras 1 o 3 semanas de ejercicio; C. Variaciones de expresión tras ayuno y realimentación. Las diferencias significativas se indican como * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. CONT: control; REALIM: realimentación.

5.2.3 La secreción y expresión de FNDC5/irisina en el tejido adiposo también se encuentra alterada en situaciones patológicas.

Dado lo interesante que resulta conocer cómo se comporta la FNDC5/irisina del tejido adiposo bajo diferentes situaciones patológicas, se midieron los niveles de expresión y secreción de esta proteína en modelos animales de obesidad y anorexia (ABA).

5.2.3.1 Secreción de FNDC5/irisina

Tanto las ratas a las que se le indujo obesidad por la dieta (DIO) como las que presentaban obesidad genética (Zucker), mostraron un aumento significativo en la secreción de FNDC5/irisina tanto en TAS como en TAVo comparado con sus controles (figuras 85A y 85B). Además, se estudió en el modelo de anorexia basada en la actividad (ABA), incluyendo animales control con ejercicio voluntario y restricción de comida; descrito en el capítulo I.

La detección de FNDC5/irisina en TAS y TAVo procedente de animales anoréxicos no mostró diferencias comparados con sus controles *ad libitum* (figuras 85A y 85B). Los animales control con ejercicio voluntario durante una semana mostraron un incremento significativo en la secreción de esta proteína en ambos tejidos como se describió en la sección anterior. Además, El TAVo del control ABA con restricción de comida pero sin ejercicio, mostró una reducción considerable en la secreción de FNDC5/irisina; este efecto se revertió al unirse el efecto del ejercicio en el TAV de las ratas ABA (figura 85B).

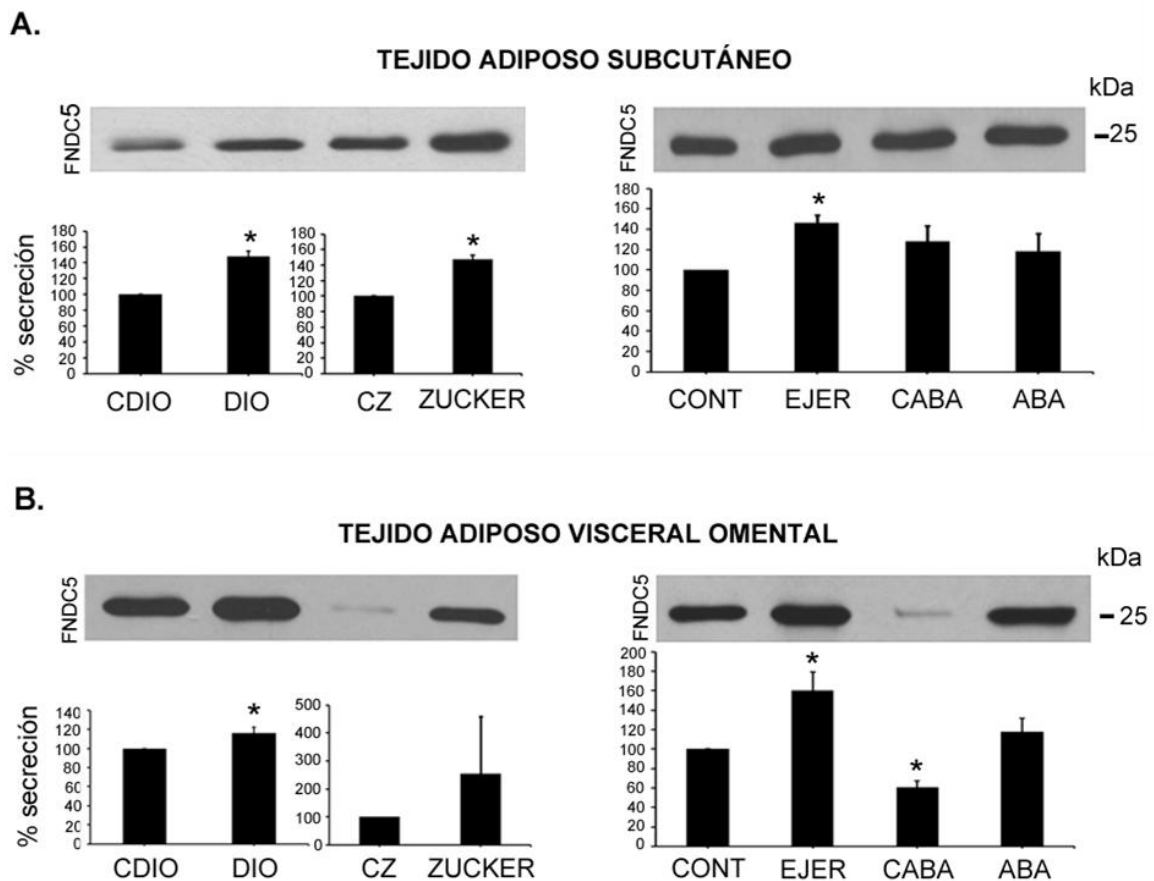


Figura 85: Análisis de la secreción de FNDC5/irisina en el tejido adiposo de los distintos modelos animales. A. Imagen representativa e histograma con la densitometría de los niveles de FNDC5/irisina en el secretoma del TAS; B. Niveles de FNDC5/irisina en el secretoma del TAVo. Las diferencias significativas se indican como * $p < 0.05$. CONT: control; EJER: ejercicio; CZ: control Zucker.

5.2.3.2 Expresión de FNDC5 intracelular y ARNm

A diferencia de lo observado en la secreción de FNDC5/irisina por parte del TA, durante el modelo ABA se observó una significativa disminución de los niveles intracelulares de FNDC5 tanto en el TAS como el TAVo (figuras 86A y 86B), presentando este último también niveles disminuidos en el control de ABA (restricción calórica sin ejercicio) (figura 86B). A nivel de mensajero no se observaron diferencias significativas en ambos tejidos.

Con respecto a los modelos de obesidad, tanto en DIO como en Zucker se observa un ligero aumento en comparación con sus controles (figuras 86), siendo más marcado en el TAVo procedentes de animales DIO (figura 86B). Los niveles de ARNm, a pesar de no observarse diferencias estadísticamente significativas (a excepción del TAS procedente del modelo Zucker), parecen seguir un patrón opuesto al observado en los niveles de proteína intracelular (figuras 86).

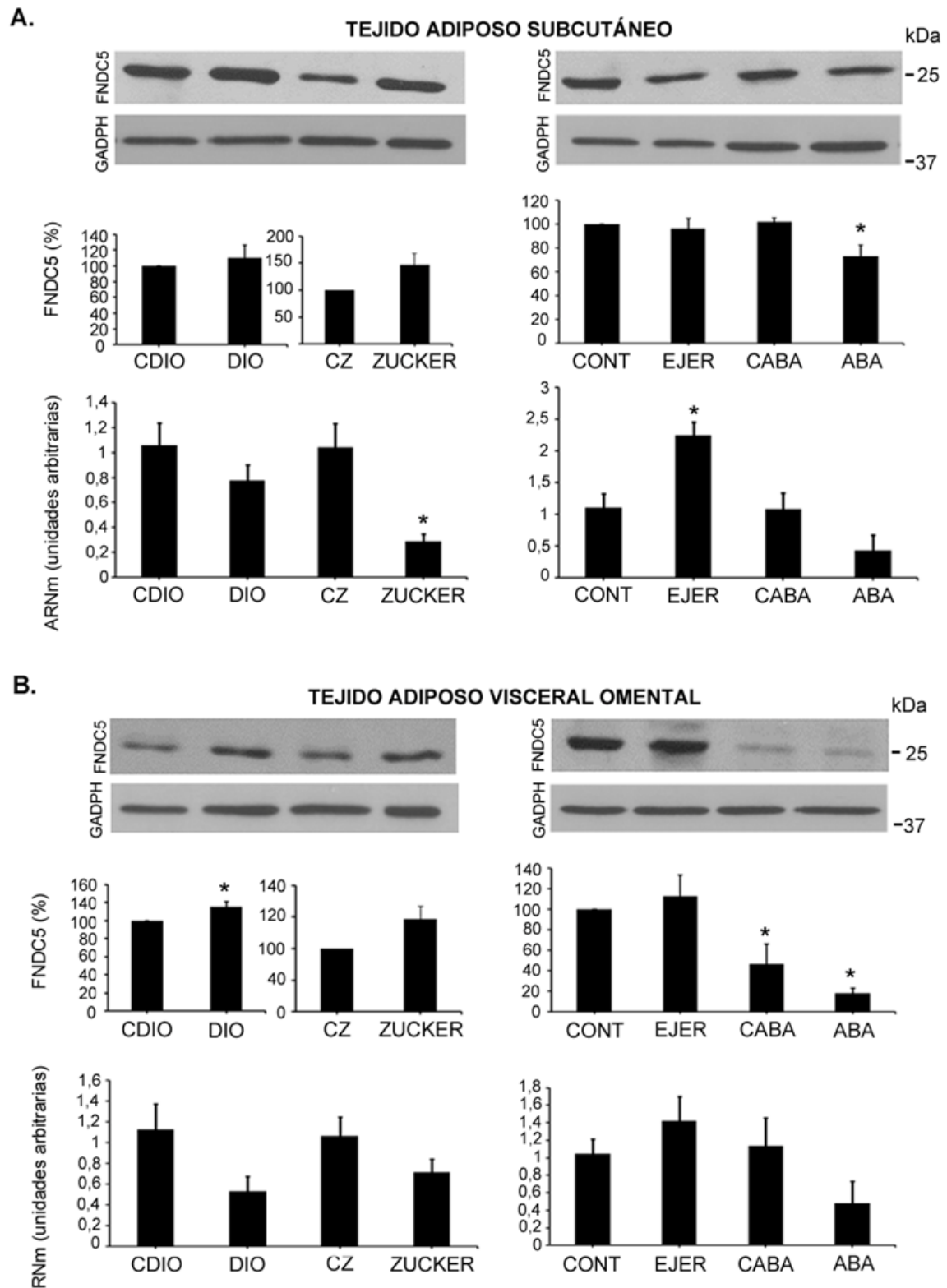


Figura 86: Análisis de la expresión del mensajero y proteína intracelular de FNDC5 en el tejido adiposo en los modelos establecidos. A. Expresión de FNDC5/irisin a nivel de proteína y mensajero en el TAS. B. Expresión de FNDC5/irisin a nivel de proteína y mensajero en el TAVo. Las diferencias significativas se indican como * $p < 0.05$. CONT: control; EJER: ejercicio; CZ: control Zucker.

5.2.4 Los niveles de FNDC5/irisina circulantes reflejan la modulación observada en los secretomas de tejido muscular esquelético y adiposo.

Se analizó por inmunodetección la concentración de FNDC5/irisina en muestras de plasma procedentes de todos los modelos animales descritos en las secciones anteriores (figura 87). Este análisis mostró un aumento significativo de FNDC5/irisina tras 1 y 3 semanas de ejercicio, tras 36 horas de ayuno y también tras 15 minutos de alimentación (tras 36 horas de ayuno) (figura 87A). Corroborando este hallazgo, se detectó un considerable aumento en el grupo control ABA únicamente con restricción de comida y en el grupo control con ejercicio. Sin embargo, los modelos de obesidad DIO y Zucker presentaron patrones opuestos en los niveles de FNDC5/irisina circulante (figura 87B); mientras que los animales DIO mostraban un aumento significativo, las ratas obesas Zucker presentaron unos niveles claramente disminuidos con respecto a su control.

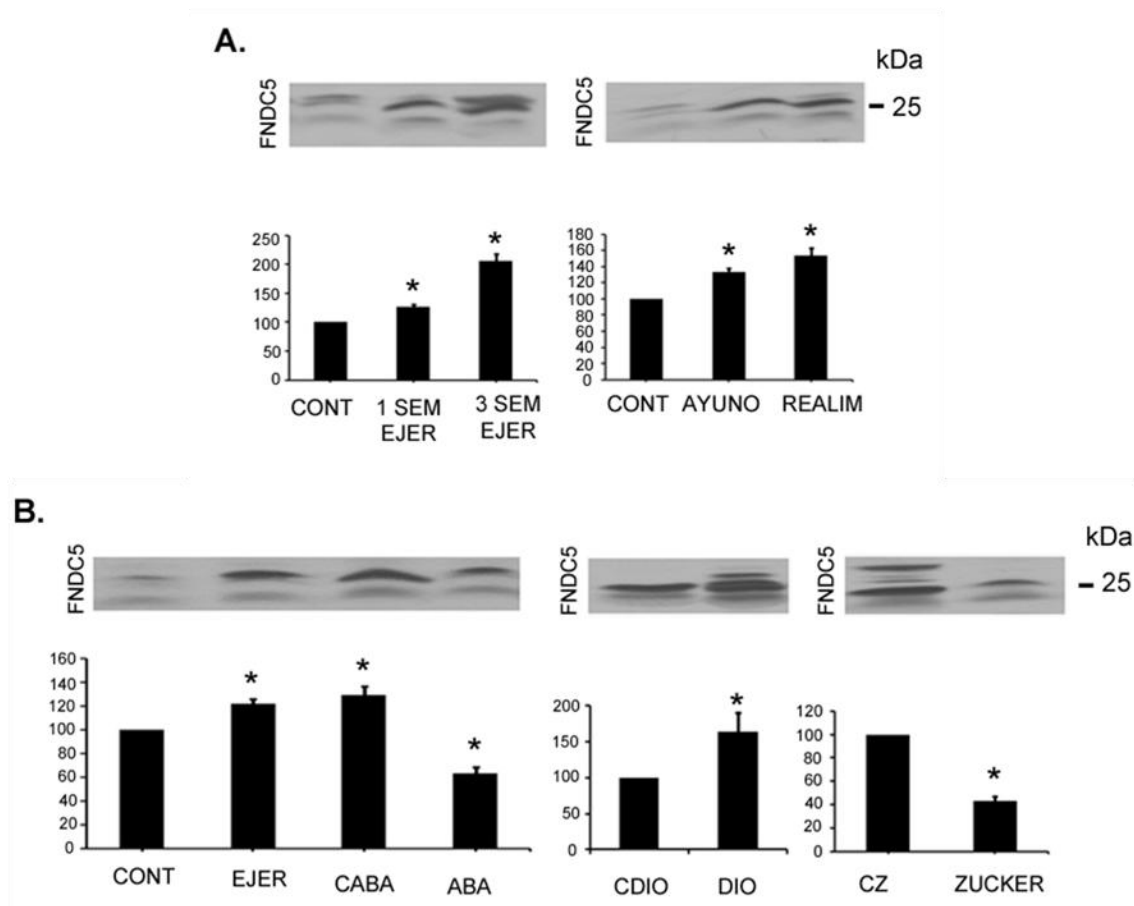


Figura 87: Análisis de los niveles circulantes de FNDC5/irisina en los diferentes modelos establecidos. Las diferencias significativas se indican como * $p < 0.05$. CONT: control; EJER: ejercicio; CZ: control Zucker.

5.2.5 La expresión de PGC1- α en el tejido adiposo no se corresponde en la mayoría de los casos con los niveles de FNDC5 observados.

Debido a las implicaciones de PGC1- α en el metabolismo energético y su papel en la activación de FNDC5 en el músculo esquelético, se analizó la expresión de los niveles de esta proteína en todos los modelos utilizados para realizar la caracterización de FNDC5/irisina en el TA (figuras 88 y 89). A nivel general, no se observaron diferencias significativas en los niveles de PGC1- α en TAS y TAVo bajo las diferentes situaciones fisiológicas (figura 88) y patológicas (figura 89). Sin embargo, se observó un aumento significativo de PGC1- α de TAS tras una semana de ejercicio, efecto que se revirtió tras largos periodos de ejercicio (figura 88B).

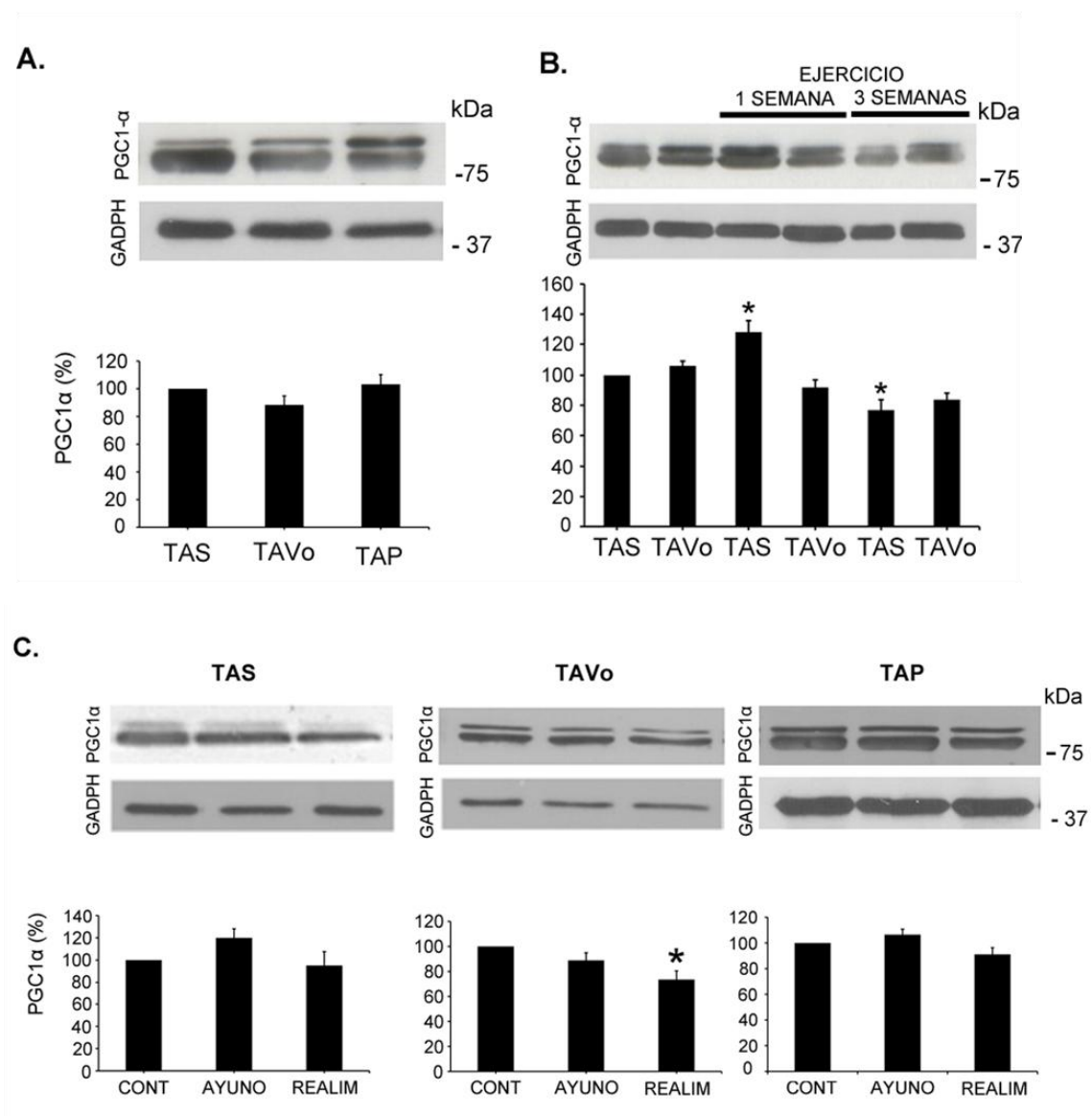


Figura 88: Análisis de la expresión de PGC1- α en TAS, TAVo y TAP en los distintos modelos fisiológicos. A. Niveles de PGC1- α en TAS, TAVo y TAP en condiciones basales; B. Expresión en los tres tipos de tejido tras 1 o 3 semanas de ejercicio; C. Variaciones de expresión tras ayuno y realimentación. Las diferencias significativas se indican como * $p < 0.05$. CONT: control; REALIM: realimentación.

De manera adicional, el TAS procedente de animales anoréxicos (ABA) (figura 89A) y el TAVo de animales obesos (DIO) (figura 89B) presentaron niveles de PGC1- α disminuídos significativamente respecto a sus respectivos controles.

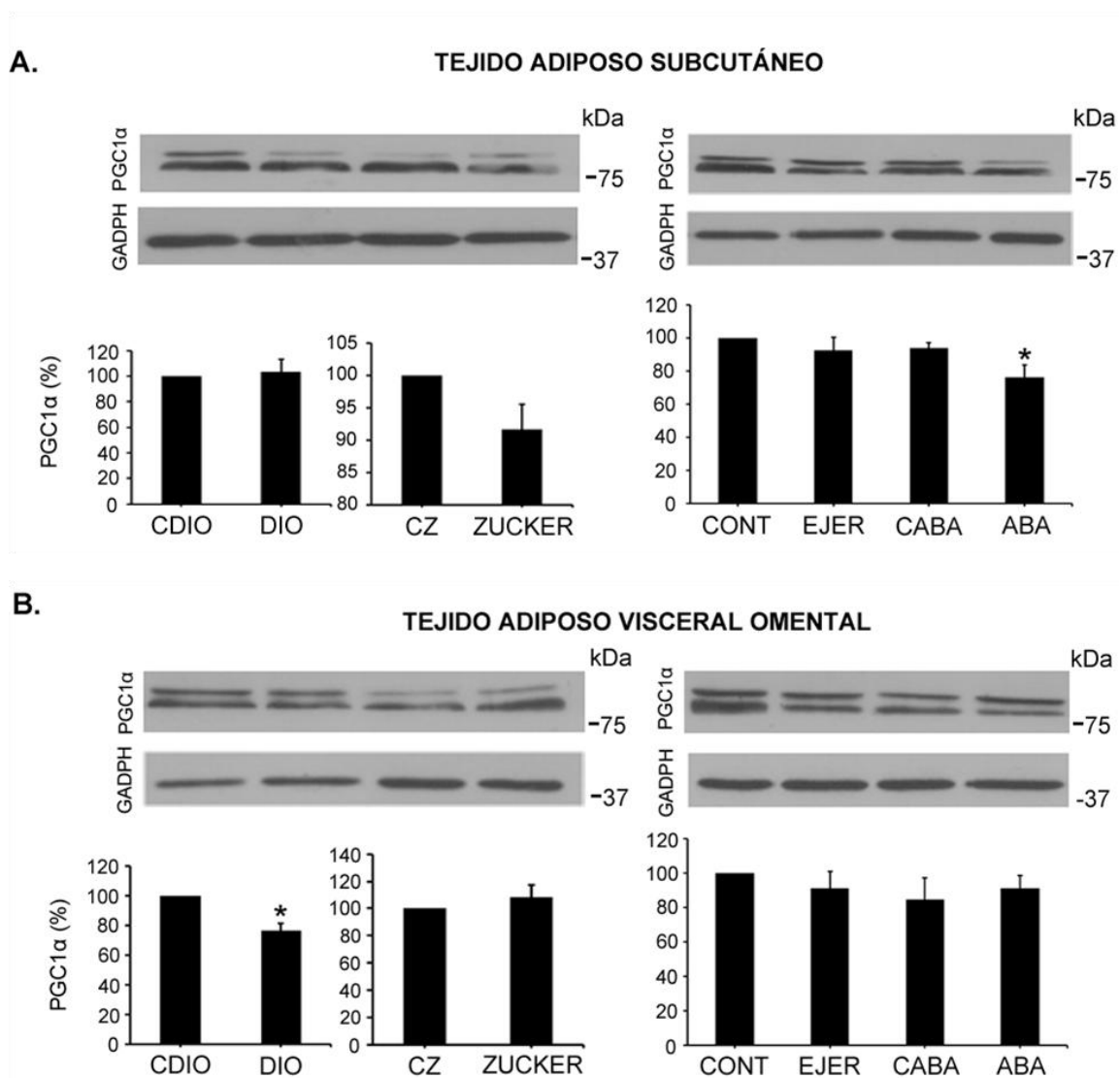


Figura 89: Análisis de la expresión de PGC1- α en el tejido adiposo en los modelos establecidos. A. Expresión de PGC1- α en el TAS. B. Expresión de PGC1- α en el TAVo. Las diferencias significativas se indican como * $p < 0.05$. CONT: control; EJER: ejercicio; CZ: control Zucker.

5.2.6 Capacidad de *browning* del tejido adiposo

Considerando el potencial efecto de la FNDC5/irisina de estimular en el tejido adiposo blanco la termogénesis y la adquisición de algunas de las propiedades del tejido adiposo pardo (*browning*) [77], se analizó la expresión de Ucp-1 en los TAS y TAV investigados en las anteriores secciones del capítulo (figura 90). Bajo condiciones normales *ad libitum*, Ucp-1 se expresó exclusivamente en TAP como se esperaba. Sin embargo, esta expresión se redujo ligeramente después de 3 semanas de ejercicio voluntario (figura 90A).

En el caso de los modelos patológicos animales, fue imposible detectar expresión de Ucp-1 en TAS y TAV tanto de los animales obesos como de sus controles. Lo mismo ocurrió en TAS con el modelo ABA y sus controles (figura 90B); sin embargo, sí que se detectó una consistente expresión en VAT tanto para el modelo ABA como para sus controles, incluyendo en ratas sometidas a ejercicio durante una semana.

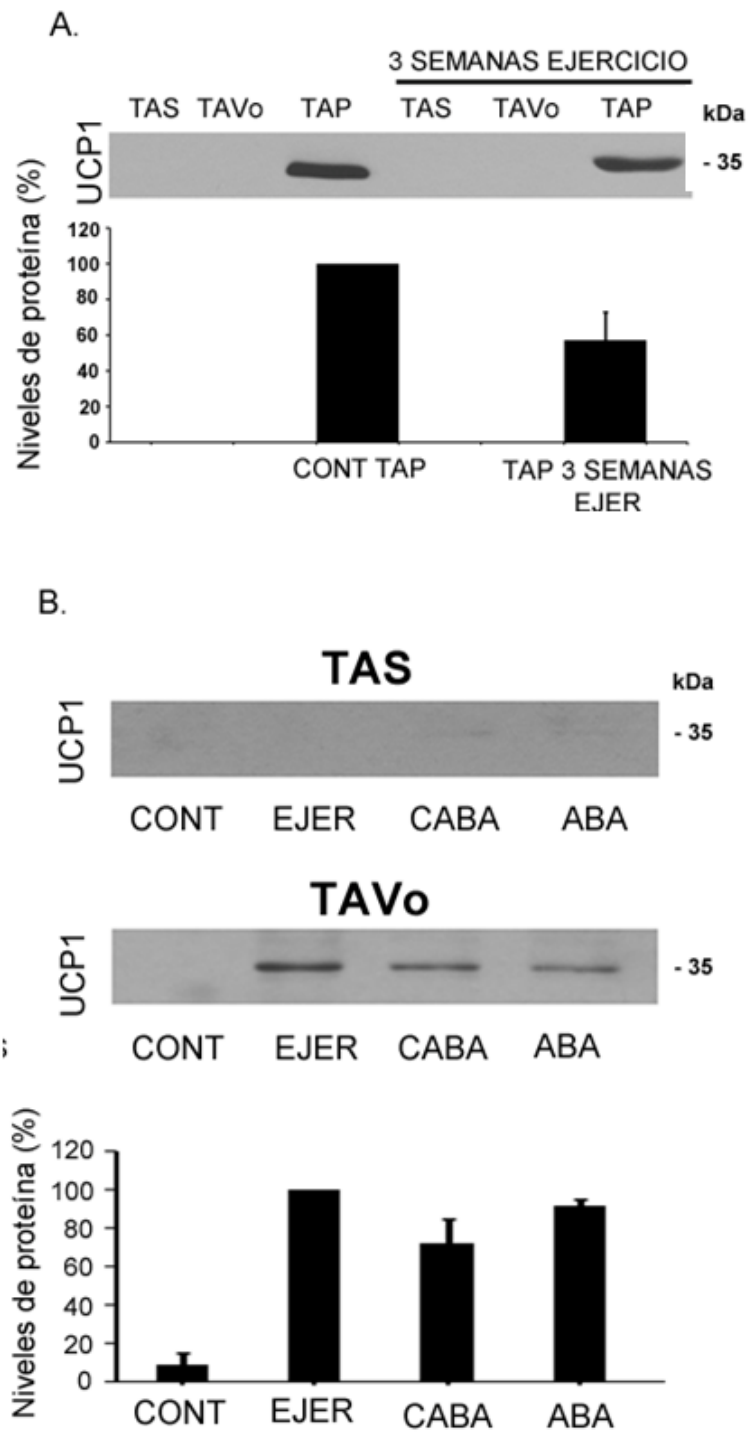


Figura 90: Análisis de la expresión de UCP-1 en el tejido adiposo en los modelos establecidos. A. Expresión de UCP-1 en el TAS, TAVo y TAP tras 3 semanas de ejercicio. B. Expresión de UCP-1 en el TAS y TAVo tras una semana de ejercicio y el modelo ABA. CONT: control; EJER: ejercicio.

5.2.7 La secreción de FNDC5/irisina la llevan a cabo los adipocitos maduros de rata y en el tejido adiposo humano también aparece expresión y secreción.

En un intento por caracterizar mejor la naturaleza de las células que están secretando FNDC5/irisina en el tejido adiposo, se analizó la secreción de esta proteína en cultivos primarios de TAS y TAV fraccionados. Los inmunoblots de los secretomas resultantes confirmaron que los adipocitos maduros eran los responsables de la secreción de FNDC5/irisina por parte del tejido adiposo en ambos casos (figura 91A). Este resultado también fue confirmado en células 3T3-L1 diferenciadas (figura 91B). Finalmente, se probó que tanto que el TAS como el SAT de origen humano también expresaban y secretaban FNDC5/irisina (figura 91C).

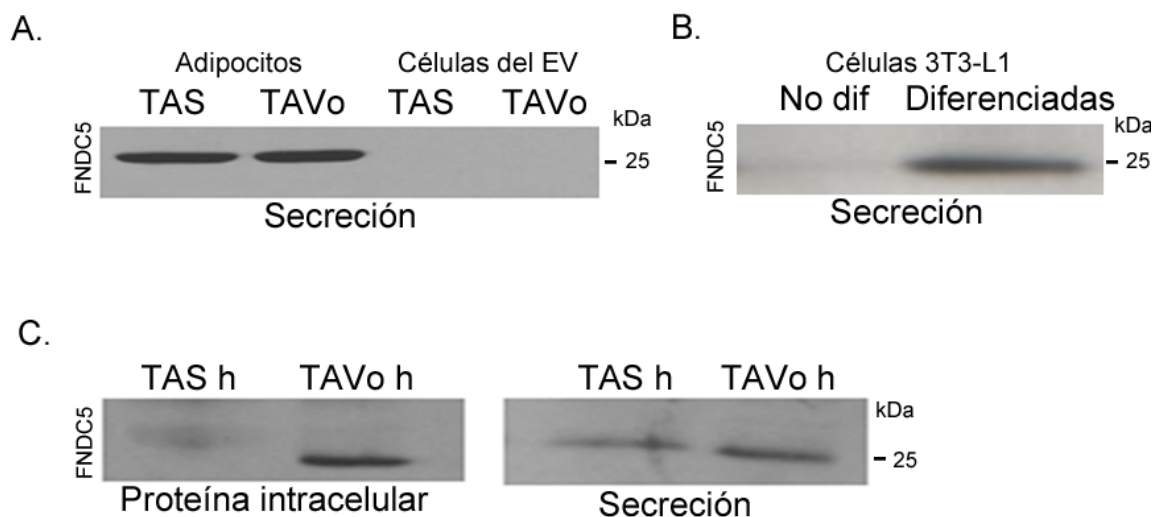


Figura 91: Caracterización de FNDC5/irisina. A. Análisis de la secreción de FNDC5/irisina en adipocitos y células del estroma vascular aisladas de TA de rata. B. Análisis de la secreción de FNDC5/irisina en células 3T3-L1. C. Análisis de la secreción y expresión de FNDC5/irisina en el TAS y TAVo procedentes de humanos obesos. EV: Estroma vascular; dif: diferenciadas; h: humano.

V. Discusión

A partir de 1994 el tejido adiposo pasó a ser considerado como un órgano endocrino secretor de una gran cantidad de factores a la circulación, las adipocinas, con la capacidad de generar distintas respuestas en órganos diana concretos y de regular el metabolismo energético global del organismo [89]. Del mismo modo, recientemente han surgido importantes estudios que han otorgado al tejido muscular esquelético, un tejido otrora considerado como inerte, el estatus de órgano endocrino propiamente dicho capaz de expresar y secretar las ahora conocidas como mioquinas. A medida que avanzan las investigaciones sobre el papel endocrino de este tejido, se van conociendo más mecanismos en los que está implicado, desde la regulación de la homeostasis de la glucosa hasta su papel activo en el desarrollo de la inflamación crónica sistémica propia de estados de obesidad, destacándose, por encima de otros tejidos con mayor o menor capacidad endocrina, como un compañero inseparable del tejido adiposo para estudios futuros de las enfermedades endocrinas relacionadas con la obesidad o la inactividad física [30, 110, 190].

Tras haber pasado ya casi dos décadas de estudio endocrino del tejido adiposo, y casi una década en el caso del tejido muscular, se conocen actualmente numerosas adipocinas y mioquinas implicadas en muchos aspectos de la regulación metabólica y la comunicación entre tejidos; de hecho son varias las proteínas que actualmente se sabe que tienen función tanto de adipocina como de mioquina, reforzando la cada vez más demostrada hipótesis de la existencia de una comunicación directa entre estos tejidos [130, 131, 191]. El mapa de nuevas adipocinas y mioquinas identificadas es cada vez mayor, sin embargo todavía se desconocen muchos factores producidos y secretados por estos tejidos que podrían ayudar al esclarecimiento de los complejos mecanismos de señalización implicados en complicaciones médicas como por ejemplo la diabetes tipo 2 [192].

Bajo este contexto, en este trabajo se planteó realizar una aproximación proteómica con el fin de obtener un mapa complejo del conjunto de posibles factores secretados por el tejido adiposo y muscular, tanto conocidos como desconocidos, como base para un mayor conocimiento de las capacidades secretoras de estos tejidos. Además esta aproximación serviría como punto de partida para la caracterización y estudio futuro de los factores identificados más relevantes y prometedores que puedan ayudar a un mejor entendimiento de las enfermedades endocrinas relacionadas con los mismos; y en su caso, el desarrollo de nuevas terapias para prevenir su aparición. No sólo este fue el objetivo de este complejo estudio, sino que con el uso de modelos animales caracterizados previamente y que emulan diferentes situaciones fisiológicas y metabólicas como el ejercicio o la dieta, se realizaron estudios de caracterización para dos hormonas consideradas clave en procesos de señalización endocrina: la fetuina A, identificada por primera vez por nuestro grupo como adipocina en el estudio de mapeo de la secreción del tejido adiposo; y la mioquina FNDC5/irisina, descubierta por el grupo de Spiegelman a

principios del año 2012. Estos estudios de caracterización han logrado incluir a estas dos prometedoras proteínas en el grupo de las adipocinas con potencial para estudios futuros de regulación metabólica y enfermedades relacionadas.

1. Establecimiento y caracterización de modelos animales en diferentes situaciones fisiológicas y patológicas.

Uno de los aspectos fundamentales en el estudio de la secreción proteica en animales y su variación atendiendo a diferentes parámetros metabólicos, es el establecimiento de unos modelos animales que presenten una serie de características que puedan emular en gran medida ciertas condiciones observadas en humanos y así poder trasladar de forma rápida y sencilla a la clínica los resultados obtenidos en estos estudios. Por tanto, no sólo es necesario seleccionar los modelos adecuados, sino que también es indispensable realizar una completa y correcta caracterización antes de su uso en estudios posteriores.

Dado que el objetivo principal de este trabajo fue el estudio de las proteínas secretadas tanto por el tejido adiposo y el tejido muscular esquelético, en especial el estudio de su variación atendiendo a diferentes condiciones metabólicas. Se seleccionaron modelos conocidos y ampliamente utilizados en estudios endocrinos como son los modelos fisiológicos de ayuno y realimentación, así como los modelos de ejercicio voluntario de distinta duración. También se utilizaron modelos patológicos como son el modelo genético de ratas Zucker y el modelo de obesidad inducida por la dieta (DIO) para estudiar situaciones de obesidad; y el modelo de anorexia basada en la actividad (ABA) para emular situaciones de desnutrición y anorexia.

En el caso de estos dos últimos modelos, en especial el modelo ABA por su escaso uso previo en estudios endocrinos, se consideró oportuno caracterizar en profundidad las principales características metabólicas definitorias para su uso potencial en estudios posteriores como modelos límite opuestos atendiendo a las condiciones resultantes de cada uno, en concreto el peso corporal y la disponibilidad energética.

En todos los modelos se optó por trabajar con ratas (*Rattus norvegicus*) de la cepa *Sprague Dawley* por su facilidad de manejo y adaptabilidad a estos modelos, así como la relativamente poca variabilidad entre individuos.

1.1 Restricción calórica, ejercicio y anorexia basada en la actividad (ABA)

El modelo ABA es un modelo animal ampliamente utilizado en estudios psicológicos para emular ciertas condiciones de la anorexia nerviosa humana [176, 193], por lo que se consideró en este trabajo, una herramienta útil a nivel endocrino dada la

combinación de factores como son la dieta y el ejercicio físico. Además este modelo presenta una serie de características únicas a otros modelos en lo referente al comportamiento de los animales, los cuales a partir del tercer día del experimento sufren un incremento progresivo en la intensidad del ejercicio realizado de forma voluntaria a pesar de estar sufriendo una dieta controlada de una hora al día, lo que supone a corto plazo una pérdida completa de su capacidad para mantener un equilibrio energético óptimo y que derivará (en el caso de mantener este modelo más allá de los 6 días) en la muerte por desnutrición del animal [194]. Sin embargo, los controles para este modelo, donde se someten a los animales al mismo tipo de dieta pero en ausencia de ejercicio, se observa una pérdida progresiva de peso hasta un determinado momento (tercer día) a partir del cual son capaces de adaptarse de manera indefinida a la restricción calórica sin poner en peligro la integridad de su organismo. Ambas situaciones refuerzan la importancia del ejercicio en su papel regulador de la homeostasis energética.

La ingesta calórica y la actividad observada en los experimentos realizados en este trabajo siguieron los mismos patrones descritos previamente en la bibliografía [176, 195]; sin embargo la composición corporal no había sido estudiada hasta este momento, comprobando que durante el estado de máxima desnutrición del grupo ABA, las mayores pérdidas de masa corporal correspondieron a las reservas de tejido adiposo, mientras que como era de esperar, en el grupo control de ejercicio, la ganancia de peso durante los 6 días que dura el experimento corresponde a masa libre de grasa, manteniendo estables las reservas de tejido adiposo corporal [196].

En la actualidad se sabe que los niveles de leptina en el suero se correlacionan directamente con el índice de masa corporal, y sobre todo con el porcentaje de grasa corporal en humanos [197]. De acuerdo a esto, durante las fases agudas de la anorexia nerviosa humana, en las cuales los pacientes presentan los valores más bajos de peso corporal, los niveles de leptina se encuentran muy por debajo del rango observado en individuos de la misma edad con IMC normales [198-200]. Los niveles significativamente disminuidos de leptina que observamos en el modelo ABA confirman la hipótesis desarrollada por Hebebrand y colaboradores que sugería que la restricción de comida en ratas con acceso a ruedas de ejercicio podría inducir la reducción de los niveles de leptina circulante; este hecho refuerza aún más la función de esta hormona como señal orexigénica. Así, los autores antes mencionados sugieren que la leptina podría ser la señal clave implicada en la hiperactividad [201]. Fue interesante comprobar que el índice HOMA observado en los diferentes grupos que componen el modelo ABA, se correlacionó con los niveles de grasa corporal y de leptina circulante. Este dato apoya los estudios que sugieren que la disminución en la concentración de glucosa plasmática es un factor determinante en el desencadenamiento del estrés fisiológico [202]. También se encontró una elevada

sensibilidad a insulina en el modelo ABA, similar a los datos obtenidos en pacientes con anorexia nerviosa [203].

Dado que cada vez existen más evidencias mostrando diferencias en el fenotipo de los adipocitos en función del depósito de tejido adiposo en el que se localicen [204], se realizó el estudio de la secreción directa de leptina a partir de explantes de tejido adiposo de diferentes localizaciones en todos los modelos. Los datos obtenidos mostraron grandes variaciones en la secreción de esta hormona por gramo de tejido, donde el TAV (tanto el gonadal como el omental, en especial este último) tiene una participación mucho mayor que el TAS durante la hipoleptinemia observada en el grupo ABA. La mayoría de aproximaciones existentes hasta este momento tratando de elucidar la aportación de los diferentes depósitos de tejido adiposo a los niveles de leptina circulante fueron realizadas a nivel de ARNm o de proteína intracelular procedente de biopsias. En estos estudios se observó que la leptina se expresa predominantemente en el TAS en comparación con el TAV [205, 206]. Otros estudios han obtenido resultados similares a partir de la secreción directa *in vitro* en explantes de tejido adiposo humano [207].

Los resultados obtenidos en la caracterización de la secreción directa de esta hormona en los grupos experimentales utilizados en esta tesis muestran niveles elevados de leptina tanto en los grupos *ad libitum* como en ejercicio y CABA, contradiciendo los estudios previamente citados; sin embargo el diseño experimental de ambos no es comparable. Los estudios de ARNm, proteína intracelular o los estudios de secreción directa citados en la literatura fueron realizados en humanos en condiciones de ayuno, mientras que los animales control en el estudio ABA fueron sacrificados tras un periodo de alimentación *ad libitum*. Así, los niveles de leptina detectados en el grupo ABA, en el cual los animales se encontraban en ayuno antes de ser sacrificados, fueron superiores en el TAS que en el TAV. Sin embargo esto no se observó en el grupo CABA, con los animales también en ayuno. Para este último resultado todavía no se ha encontrado explicación.

De manera opuesta a la leptina, los niveles de ghrelina estuvieron inversamente correlacionados con el porcentaje de grasa corporal de los animales pertenecientes al estudio ABA tal y como está descrito en la anorexia nerviosa humana [208]. Las acciones de la leptina y de la ghrelina han sido estudiadas profusamente a nivel central [209, 210], sin embargo sus efectos a nivel periférico todavía son poco conocidos. Los receptores de leptina y ghrelina han sido descritos en varios tejidos implicados en el metabolismo, como el hígado, tejido adiposo o músculo [211, 212]; pero no han sido caracterizados hasta el momento los efectos de la restricción calórica y el ejercicio, incluida la anorexia, sobre estos receptores.

Se estudió la presencia del receptor de ghrelina GHS-R1a y el receptor de leptina LEPR en el músculo y en el tejido adiposo extraídos al finalizar el experimento;

observando que en animales con balance energético negativo, especialmente aquellos que presentaron unos niveles muy elevados de ghrelina circulante (grupo ABA), la regulación parece ocurrir de una manera específica por tipo de tejido. Esto podría constituir un mecanismo de defensa que evite la desregulación de la homeostasis energética en situaciones en las que se produce un desequilibrio energético. De esta forma, se observó que la expresión de los receptores de leptina y ghrelina en el tejido muscular difiere según su composición de fibras. El receptor de ghrelina estaba más elevado en el músculo sóleo (con mayoría de fibras oxidativas lentas) en condiciones de ejercicio y restricción calórica, sin embargo, esta expresión se encuentra alterada en el grupo ABA, probablemente porque estos animales se encuentran en una situación extrema en la cual las fibras musculares empiezan a dañarse. Por otra parte, se estudió la expresión de los receptores de leptina en estas mismas muestras de tejido muscular, partiendo de la base que esta hormona es capaz de activar el metabolismo de la glucosa y de los ácidos grasos en el músculo esquelético [211]. En este caso se observó la presencia de dos isoformas, una forma corta inactiva y una forma larga con la capacidad de llevar a cabo la señalización intracelular. Fue interesante ver que existía una mayor expresión de la forma activa en el músculo sóleo del grupo ABA en comparación con el músculo gastrocnemio (con mayoría de fibras glucolíticas rápidas). Este hecho parece sugerir que el tipo muscular oxidativo de estos animales presenta una mayor sensibilidad a la acción de la leptina que el músculo del tipo glucolítico probablemente en un intento de asegurar el aporte de energía que necesita este músculo en períodos de hipoleptinemia crónica. Estudios previos han demostrado que LEPR no varía en condiciones de ayuno o alimentación a corto plazo [213], sin embargo en el caso de los resultados obtenidos al estudiar el modelo ABA, se observa que estos receptores se encuentran regulados en condiciones de balance energético negativo a largo plazo.

En el caso del tejido adiposo, el efecto de la ghrelina todavía es controvertido, ya que en algunos estudios se le atribuye un papel en el incremento de los depósitos de tejido adiposo [214, 215], mientras que en otros estudios se sugiere que esta hormona puede estar implicada en la inhibición de la adipogénesis [216]. Estos efectos atribuidos a la ghrelina podrían ser el resultado del uso de diferentes modelos experimentales, el tiempo de exposición a la ghrelina o el uso de tejido adiposo procedente de distintas localizaciones [217]. En el estudio del experimento ABA se observa que el TAS y TAVo de los grupos de ejercicio y CABA presentan una mayor sensibilidad a ghrelina que el TAVg. Sin embargo, fue todavía más interesante comprobar que en el TAVo del grupo ABA la expresión del receptor GHS-R1a se encontraba mucho más elevada que en el resto de depósitos de tejido adiposo. Estos hallazgos se correlacionan con estudios previos que mostraron que la ghrelina puede impedir la lipólisis en los adipocitos procedentes de TAV en los estados de balance energético negativo a través del receptor GHS-R1a [217].

De acuerdo con el papel del TAVo preservando las reservas energéticas descrito arriba, se observó que la forma activa del receptor LEPR se encontraba completamente ausente en este depósito en situaciones de balance energético negativo. Dado que la leptina está implicada en la oxidación de ácidos grasos por parte del tejido adiposo, la ausencia de la forma larga de LEPR sugiere su papel en la respuesta adaptativa a la escasez de energía. Por otra parte se observó que el TAVg presenta un perfil de expresión de LEPR similar al TAVo, con una mayor expresión de la forma corta, mientras que el TAS se caracteriza por la presencia de ambas formas. Estos datos reforzarían la hipótesis de las diferentes funciones llevadas a cabo por el tejido adiposo en función de su localización anatómica [204]. En definitiva, los resultados obtenidos sugieren que el TAS respondería con mayor eficacia a la acción de la leptina en todos los grupos del experimento ABA.

1.2 Obesidad inducida por la dieta (DIO)

Desde hace ya varias décadas, los modelos animales que intentan emular la obesidad humana han sido utilizados con asiduidad aportando datos muy relevantes y críticos para el avance de la investigación endocrinológica. A partir de los estudios llevados a cabo sobre los ratones ob/ob, por ejemplo, se produjo uno de los hitos más importantes en la historia de la endocrinología moderna, el descubrimiento de la leptina [66]. Existen numerosos modelos diferenciados entre sí por el tipo de animal utilizado, tipo de dieta al que se somete o modificación genética que presente; todos ellos con el propósito principal de obtener un fenotipo de obesidad que permita el estudio de esta enfermedad y otros desórdenes relacionados con ella y entender mejor los mecanismos por los que se producen, así como la elaboración de tratamientos que logren revertir alguna de estas enfermedades [218].

En este trabajo se utilizaron dos tipos de modelos distintos de obesidad, ambos realizados en rata. Un modelo de obesidad genética, el modelo de ratas Zucker (fa/fa), un modelo ampliamente estudiado desde hace décadas que presenta una mutación autosómica recesiva que en los individuos homocigotos afecta a la funcionalidad del receptor de leptina, impidiendo la acción orexigénica de esta hormona y originando un fenotipo de obesidad y de resistencia a la acción de la insulina [178, 219]. El otro modelo utilizado es la obesidad inducida por la dieta (DIO), modelo más cercano al objetivo de emular la obesidad humana, ya que el auge de la dieta hipercalórica de las últimas décadas ha convertido a la obesidad en un grave problema médico mundial de características pandémicas [9]. Existen diferentes tipos de dietas para lograr un fenotipo de obesidad en ratas, en este trabajo se ha utilizado una dieta comercial sólida de alto contenido calórico con el fin de homogeneizar al máximo sus efectos sobre los animales estudiados.

Dado que el fenotipo resultante en el caso del modelo Zucker es muy robusto debido a su carácter genético, y de que se trata de un modelo muy estudiado a lo largo de las últimas décadas; no se consideró necesario realizar una caracterización previa más allá de la monitorización de su peso corporal e ingesta de comida. Sin embargo en el caso del modelo inducido por la dieta, a pesar de ser un modelo bien estudiado, existen otros factores que pueden influir en la eficacia del modelo y es común que dentro de una misma población se detecten animales con un fenotipo de resistencia a la obesidad [220]. De esta forma fue necesaria la realización de un seguimiento previo de ciertos parámetros básicos con el fin de monitorizar a los animales, descartando resistentes para obtener una muestra poblacional óptima que comparta el fenotipo de obesidad requerido para los estudios subsiguientes.

El modelo DIO tuvo una duración de 10 semanas durante las cuales los animales fueron alimentados con una dieta hipercalórica alta en grasas. A partir de la primera semana de peso ya se observaron diferencias significativas en el peso de los animales en comparación con los controles alimentados con dieta estándar, peso que correspondió en mayor medida al incremento de masa grasa. Respecto a la comida ingerida, se produjo un efecto de hipofagia sostenido a lo largo de todo el experimento, contradiciendo en cierta medida estudios previos que han descrito el desarrollo con el tiempo de una hiperfagia en los animales sometidos a este tipo de dietas [221, 222]; este hecho puede estar causado por la activación de sistemas anorexigénicos relacionados con el tipo de comida suministrado, atendiendo a estímulos externos como la palatabilidad, el olor o el color [223]. El test oral de tolerancia a la glucosa en el grupo DIO mostró una distribución típica observada en animales que presentan una marcada intolerancia a la glucosa o incluso resistencia a la acción de la insulina [224].

Al igual que en el experimento ABA, se estudiaron los niveles de leptina y ghrelina circulantes. De acuerdo a la ya conocida correlación entre los niveles de leptina y el índice de masa corporal y el porcentaje de tejido adiposo [197], se observaron niveles significativamente más altos de esta hormona en los animales del grupo DIO. Al tratar de averiguar que depósito de tejido adiposo era el responsable en mayor medida de la liberación de leptina, se observó que al igual que en el experimento ABA, el TAV (en especial el TAVo) secretaba mucha más leptina que el TAS en condiciones de obesidad, volviendo a contradecir estudios previos que afirmaban lo contrario probablemente porque el diseño experimental de ambos no es comparable [205-207]. Es interesante destacar que el TAVo fue el único depósito que mostró diferencias significativas en los animales del grupo DIO frente a su control, de manera similar a lo observado a nivel plasmático; estos datos son reforzados con los estudios que muestran una clara correlación entre los niveles de leptina circulante y el radio de circunferencia de la cintura, parámetro que mide de manera indirecta la obesidad abdominal [225], y estudios que asocian la disminución TAV con la reducción en los niveles de leptina

plasmática [226]. Con respecto a la ghrelina circulante, se observaron niveles mucho más elevados en el grupo DIO respecto a los controles. Este dato parece estar en contradicción con los estudios en los que se correlacionan negativamente los niveles de ghrelina en animales que han mantenido durante largo tiempo una dieta alta en grasas [227, 228]; sin embargo estos datos fueron obtenidos tras un periodo de ayuno de los animales, mientras que en este estudio de caracterización, los animales se encontraban en un régimen *ad libitum*. Se ha demostrado en diferentes trabajos que la supresión postprandrial de la liberación de ghrelina a la circulación depende del contenido de la comida ingerida, siendo las dietas altas en grasa las que posponen por mayor tiempo esta supresión [229, 230].

2. Caracterización del secretoma del tejido adiposo blanco en función de su localización anatómica.

Desde su caracterización como órgano endocrino, el tejido adiposo ha sido objeto de numerosos estudios para tratar de averiguar el complejo entramado de factores secretados por este tejido y su papel endocrino en el organismo. En la mayoría de estos estudios no se ha tratado con la suficiente profundidad la caracterización de los diferentes depósitos de tejido adiposo, y menos aún distinguir entre los diferentes papeles que parecen tener entre sí dependiendo de su localización [73, 82, 231]. Actualmente está muy extendida la práctica de realizar comparaciones entre el TAS y el TAV procedentes de animales de experimentación de una forma general sin atender a la procedencia de dichos depósitos o la potencial traslacionalidad de los resultados a la fisiología humana, máxime cuando dentro del TAV se engloban depósitos con funciones e implicaciones tan distintas como presentan el TAVo y el TAVg [80, 83], siendo este último, también conocido como TA epididimal, el más usado en este tipo de estudios como representante del TAV [77, 232-234].

En este trabajo se mostró por primera vez, la caracterización del secretoma y el análisis diferencial de explantes de tejido adiposo de diferentes localizaciones anatómicas mediante electroforesis bidimensional (2-DE) y espectrometría de masas (MALDI-TOF/TOF). Concretamente, se realizaron mapas de referencia del secretoma del TAVo, TAVg y TAS mediante la selección e identificación de las manchas más relevantes detectadas en los geles de 2-DE. Además se hizo un análisis diferencial de los tres depósitos de TA. La espectrometría de masas permitió la identificación tanto de adipoquinas clásicas ya conocidas como de nuevas proteínas secretadas de gran interés potencial. Los resultados obtenidos en esta aproximación proteómica sirven para apoyar la hipótesis, comentada arriba, en la que trabajan numerosos grupos de investigación que sugieren la existencia de diferencias fisiológicas existentes en el TA dependiendo de su localización anatómica [82, 162, 163]. Además, fruto de este

estudio, se han establecido una serie de mapas de referencia que servirán para futuros estudios de la secreción del TA [148].

2.1 Establecimiento y validación de los secretomas a partir de explantes de TA

A pesar del gran interés suscitado por elucidar la dinámica secretora del TA para incrementar el conocimiento sobre los mecanismos moleculares que controlan el peso corporal, muy pocos estudios han hecho una aproximación proteómica por 2-DE para caracterizar el secretoma del TA, probablemente debido a las dificultades técnicas inherentes a este tipo de muestras. La mayoría de trabajos realizados hasta la fecha, se habían centrado en el estudio de cultivos primarios de adipocitos o de líneas celulares [146, 152, 155]. Previamente a este trabajo, se realizaron estudios de explantes de TA completo usando electroforesis monodimensional y SELDI-TOF (Desorción/ionización por láser de superficie variante mejorada) [150, 235]; sin embargo, hasta este trabajo no existía ningún estudio que se centrara en la caracterización del secretoma de explantes de TA procedente de ratas.

La caracterización del secretoma realizado en este estudio, dio como resultado el establecimiento de mapas de referencia para el TAVo, TAVg y TAS de ratas macho adultas bajo condiciones *ad libitum*. El tipo de proteínas identificadas fue muy distinto al comparar los secretomas de cada tejido, hecho que fue confirmado al realizar el análisis diferencial de los tres depósitos. Al igual que durante el análisis cuantitativo por radioinmunoensayo realizado en el estudio anterior, se comprobó por inmunodetección que los niveles de secreción de leptina difieren de manera muy marcada según la localización anatómica del depósito de TA. Esta variación en la secreción de esta proteína refuerza la hipótesis de que el TA presenta funciones diferentes dependiendo de su localización. Bajo este contexto, hay que considerar también que algunas proteínas podrían no detectarse debido a limitaciones inherentes a las técnicas y tipo de muestras usadas, como la presencia de artefactos (por ejemplo la presencia de lípidos en la muestra), resolución baja de los geles o la identificación negativa de las manchas mediante MS. La imposibilidad de detectar leptina en los secretomas de depósitos de TA, y adiponectina en el secretoma de TAS en el estudio proteómico, puso de manifiesto estas limitaciones. También debe ser considerado que sólo se seleccionaron para su identificación las manchas más representativas durante la confección de los mapas de secreción, mientras que en el análisis diferencial, sólo se consideraron las manchas que presentaban una diferencia significativa con un valor de $p < 0.001$. De todas formas, al realizar el análisis diferencial, se identificó por MS la adiponectina significativamente secretada, resultado que fue paralelo al obtenido por inmunodetección.

Otro aspecto que debe ser discutido en este apartado es la aparición de proteínas que no presentan péptido señal ni algún tipo de secreción no convencional en los

secretomas objeto de estudio. Para los mapas de referencia, estas proteínas correspondieron al 41.5% del total identificado en el secretoma del TAVo y el 45% en los secretomas del TAS y TAVg. La presencia de estas proteínas está relacionada con la inevitable rotura celular debida a la manipulación de la muestra (especialmente los adipocitos, que son células muy frágiles) y a artefactos de la muestra; todo ello descrito previamente en diferentes estudios de secretomas de células y tejidos [236, 237]. Para minimizar al máximo estos problemas, se optimizaron las técnicas de procesado de los tejidos de forma que se eliminaron la mayoría de los contaminantes procedentes de la irrigación sanguínea del TA. Por otro lado, se tuvieron en cuenta recientes investigaciones que revelan la capacidad de algunas proteínas de trasladarse entre los compartimentos intracelular y extracelular por mecanismos no convencionales. La capacidad de estas proteínas para moverse entre compartimentos podría suponer la identificación de nuevas funciones diferentes a las descritas en la bibliografía para las mismas [238]. Bajo este contexto, las proteínas identificadas fueron analizadas mediante un software de predicción de proteínas secretadas capaz de discernir entre aquellas que presentan péptido señal y aquellas cuya secreción es no convencional [139, 186]. Fue interesante comprobar como del total de las proteínas identificadas tras realizar el análisis diferencial, el 74% correspondían a proteínas secretadas (incluyendo péptido señal o algún tipo de secreción no convencional). Este alto número identificado indica que el software de análisis de imagen es capaz de minimizar los posibles artefactos presentes en las muestras, ya que estos no presentan diferencias reales. La variación en la secreción de estas 45 proteínas fue dependiente del depósito de TA, reafirmando los diferentes papeles que presenta el TA según su localización. De estas 45 proteínas se validaron por inmunodetección la adiponectina y una nueva proteína diferencialmente regulada llamada galectina-1, correlacionándose los resultados con los obtenidos en el análisis diferencial.

2.2 Los mapas 2-DE de referencia de los secretomas de TAVo, TAS y TAVg reafirman la hipótesis de que el tejido adiposo presenta diferentes funciones dependiendo de su localización anatómica.

En los mapas de secreción se identificaron adipoquinas conocidas relacionadas con la sensibilidad a la insulina y con propiedades anti-inflamatorias como la adiponectina; adipoquinas relacionadas con el metabolismo lipídico (proteína de unión de retinol 4), con la regulación de la presión sanguínea (angiotensinógeno), proteínas de fase aguda (haptoglobina y el componente amiloide P sérico), proteínas de la adipogénesis (colágeno, galectina-1 y nidógeno-1), o quimioquinas asociadas a la inflamación (factor inhibidor de la migración de macrófagos). Sorprendentemente, tanto en este estudio como en otras aproximaciones proteómicas similares a lo largo de la bibliografía, no ha sido posible la detección de leptina u otras adipoquinas bien caracterizadas [150, 235]. El papel de muchas de las nuevas proteínas identificadas todavía no está claro y menos

aún su relación con el TA, por lo que será necesario realizar estudios adicionales de las mismas en el futuro para una mejor caracterización.

Se utilizó el software de análisis de rutas de interacciones entre proteínas para investigar las relaciones entre todas las proteínas secretadas identificadas por depósito de TA, obteniéndose varias redes independientes de procesos biológicos por cada depósito adiposo. En concreto, entre las proteínas secretadas por el TAVo, varias se encontraban relacionadas con el complejo NFkB (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas), relacionado con la transcripción de factores capaces de controlar la expresión de genes implicados en la respuesta inmune, apoptosis y ciclo celular [239]. Se detectó también un nexo entre el secretoma del TAVo y la ruta de señalización JAK/STAT, regulada por la hormona leptina; además muchas de las proteínas de este TA fueron agrupadas por su implicación en el metabolismo de carbohidratos, mientras que algunas de ellas se relacionaron directamente con el transportador de glucosa 4 dependiente de insulina (Glut4/SLC2A4). De manera adicional, se encontraron interacciones indirectas con la ruta de señalización Ras-Raf-ERK, implicada en la proliferación celular, diferenciación y supervivencia; ruta que se ha demostrado que se encuentra activada durante la diferenciación de la línea celular 3T3-L1 [240]. En el caso de las proteínas secretadas por el TAS, muchas de ellas estaban implicadas en la eliminación de radicales libres, protegiendo frente a las especies reactivas del oxígeno producidas durante la oxidación de ácidos grasos en este tejido. De manera similar al TAVo, este depósito parece estar relacionado con el factor NFkB. Finalmente, el mapa de interacciones generado para el TAVg lo relacionan con la hormona luteinizante (LH) y la hormona estimuladora del folículo (FSH), apoyando la hipótesis de que este depósito concreto de TA se encuentra más relacionado con la función reproductora que con la homeostasis energética global [83].

2.3 El análisis diferencial del secretoma de los tres depósitos de TA muestra la existencia de grandes diferencias con respecto a su capacidad secretora.

El estudio diferencial de los diferentes depósitos de tejido adiposo en ratas reveló la diferente naturaleza de las adipoquinas secretadas por el TAVo, TAS y TAVg. El análisis de componentes principales realizado para todas las manchas detectadas, apoyó las diferentes investigaciones basadas en técnicas no proteómicas que sugieren la existencia de las diferentes funciones llevadas a cabo por estos tejidos [241]. Es importante destacar que los resultados obtenidos se correlacionan bien con anteriores trabajos. Por ejemplo, la secreción de trombospondina-1 (relacionada con la obesidad, inflamación del TA y la resistencia a la insulina) se encontró aumentada en el TAVo con respecto al TAS en pacientes obesos [242], un patrón de secreción similar al observado en este trabajo. También fue importante encontrar niveles de angiotensinógeno más

elevados en el TAVo frente al TAS, tal y como se describió previamente [243]; además el angiotensinógeno producido por el TA se ha encontrado muy elevado en humanos obesos, probablemente contribuyendo a elevar los niveles de esta proteína en la circulación [244]. Proteínas identificadas en este estudio como la gelsolina, previamente descrita en un trabajo de expresión génica en el TA [245], detectada únicamente en el TAVo, o la proteína relacionada con la adipogénesis galectina-1, secretada en mayor proporción por el TAVo, requerirán estudios posteriores.

En resumen, este estudio muestra por primera vez el análisis por 2-DE de proteínas secretadas específicamente por el TA procedente de tres depósitos distintos en ratas bajo condiciones *ad libitum*. Los mapas de referencia resultantes y las distintas proteínas identificadas por MS, serán muy útiles para futuros estudios de caracterización de las proteínas secretadas por los distintos depósitos de TA. Los resultados de este estudio refuerzan el papel diferencial del TA en función de su localización anatómica y puede servir para incrementar el conocimiento sobre la patogénesis molecular de la obesidad y enfermedades relacionadas.

3. Validación y caracterización de la fetuina A como nueva adipoquina.

Tras la caracterización de los mapas de secreción y el análisis diferencial de los distintos depósitos de tejido adiposo en rata, se encontraron una serie de proteínas secretadas que no habían sido relacionadas anteriormente con este tejido y cuyas funciones conocidas eran potencialmente prometedoras para continuar con su estudio más en profundidad. Una de estas proteínas fue identificada como fetuina A (alfa-2-HS-glicoproteína).

La fetuina A es una proteína secretada a la circulación sanguínea producida por el hígado, lengua y placenta [57]; pero que hasta el momento nunca había sido identificada como producto del TA. Actúa como un inhibidor natural del receptor tirosina-quinasa de insulina, lo que la convierte en un factor muy relevante en el desarrollo de enfermedades relacionadas con la señalización de insulina. Se demostró en ratones deficientes para el gen que codifica la fetuina A, que estos presentan una mayor sensibilidad a la insulina y resistencia a la obesidad inducida por la dieta [58]; además se describió que esta proteína afecta a la señalización de insulina de los adipocitos y fue asociada con diabetes tipo 2 [59, 60].

3.1 La secreción de fetuina A en el TA se produce exclusivamente por los adipocitos y los niveles séricos están afectados por la obesidad y la restricción calórica.

Al ser una proteína muy abundante en el suero, lo primero que se podría pensar es que esta proteína aparece en los secretomas de TA debido a una contaminación de la secretada por el hígado, o debido a un artefacto inherente a la técnica usada. Para descartar esta situación se comprobó su expresión en el mensajero de TA, así como en adipocitos aislados. De esta forma se confirmó su presencia en el TA y se vió que los adipocitos son los responsables de la secreción de fetuina A; así se puede concluir que la proteína que aparece en los secretomas no procede de la sangre que irriga el tejido. La expresión de la fetuina A en el TA podría estar indicando que este tejido presenta un papel activo en la señalización de la insulina independiente de la expresión de los receptores de insulina en su membrana plasmática, mediante una regulación autocrina/paracrina o incluso endocrina de la acción de la insulina en el TA. Si bien actualmente no se conocen en profundidad las bases moleculares mediante las cuales se origina la resistencia a insulina de los tejidos en situaciones de obesidad, en numerosos estudios se han observado deficiencias en los receptores de insulina de diferentes tejidos que impiden total o parcialmente la unión de la insulina llegando a producir en los casos más graves un estado de diabetes tipo 2 [56, 246, 247]. Por lo tanto, una posible respuesta al desarrollo de al menos una parte de los casos de resistencia a la insulina observados en la clínica podrían deberse a la presencia de factores que modifiquen la eficiencia de estos receptores. Como se describe más arriba, la fetuina A es uno de estos factores que influyen en la señalización de la insulina a través de su receptor y ya se ha relacionado su presencia con la resistencia a insulina [58]. El descubrir que el TA también es capaz de producir esta proteína podría suponer que esta resistencia estaría debida, al menos en algunos casos, a factores secretados localmente; o que incluso el TA estaría implicado de una manera directa en el desarrollo de algunas formas de resistencia a insulina que podrían derivar en diabetes tipo 2 mediante la acción de la fetuina A, atendiendo a la correlación que se ha observado en multitud de estudios entre el porcentaje de TA en el organismo (en especial de TAV) y la resistencia a insulina [248-250].

Como era de esperar, en el modelo de obesidad inducida por la dieta usado en este estudio, los niveles de fetuina A circulantes se encontraron muy elevados respecto a su control; esto concuerda con estudios previos que han observado el mismo perfil tanto en modelos animales como en humanos [42, 251] que evidencian una relación entre la resistencia a insulina y la fetuina A. Si se comparan los resultados obtenidos en el test oral de glucosa durante la caracterización del modelo DIO, esta relación se ve aún más reforzada ya que se observa una relación directa entre los niveles de fetuina A y la intolerancia a la glucosa. Con respecto al experimento ABA, sorprendentemente observamos como la peculiar restricción calórica a la que son sometidos los animales del grupo control ABA induce un marcado incremento en los niveles de fetuina A en el suero analizado. Existen pocos trabajos que comprueben los efectos de la restricción

calórica sobre los niveles de esta proteína, sin embargo en el estudio llevado a cabo por Choi y col. se observó que en pacientes obesas con diabetes tipo 2 sometidas a una dieta hipocalórica durante 12 semanas, los niveles de fetuina se reducían significativamente [252]. Si bien los resultados no son comparables por la duración de la restricción calórica en estas pacientes y las características mismas del tipo de restricción, se puede deducir que la restricción calórica a corto plazo puede estar induciendo el incremento de la secreción de fetuina A a la circulación; sobretodo teniendo en cuenta que los animales fueron sacrificados tras 23 horas de ayuno a la misma hora a la que en días anteriores estos eran alimentados. De esta forma, la secreción de fetuina A podría estar siguiendo un patrón de secreción aguda al igual que otras hormonas del sistema digestivo como la ghrelina [253, 254] anticipándose a la liberación de insulina con la comida. De todas formas, este efecto anticipatorio se revierte al someter a estos animales a ejercicio físico voluntario. El ejercicio físico en sí mismo, como está descrito anteriormente, no afecta a los niveles de fetuina A [255].

3.2 El TAVo participa en mayor medida que el TAS en la modulación de la expresión y secreción de fetuina A.

Al comprobar los niveles de expresión y secreción de fetuina A en los depósitos de TA mayoritarios en rata, se observó que mientras en el TAS no se encontraron apenas variaciones en todos los modelos observados, en el TAVo los niveles se vieron afectados por la restricción calórica, la obesidad y en menor medida el ejercicio. El TAVo es un depósito de TA muy importante para los investigadores en obesidad, pues este ha sido asociado en multitud de ocasiones con las comorbilidades derivadas del incremento de TA corporal de manera independiente al TAS, el cual se considera incluso un tejido protector frente a esta enfermedad [80, 82, 256, 257]. Esta mayor implicación del TAVo en cuanto a la expresión y secreción de fetuina A podría relacionar directamente por un lado la gran cantidad de estudios que asocian el incremento de TAVo con la resistencia a insulina, y por otro lado, los estudios que observan una correlación directa entre los niveles de fetuina A con esta resistencia. De esta forma, se podría sugerir que la fetuina A liberada a la circulación por el TAVo podría estar contribuyendo a un estado de resistencia a insulina o incluso a la diabetes observada en pacientes obesos, en especial aquellos con un elevado porcentaje de TAVo [73].

Hasta la fecha se considera al hígado como el mayor productor de fetuina A del organismo [57] y la mayoría de estudios sobre esta proteína se basan en esta misma hipótesis [61-63]. Sin embargo ningún trabajo se ha centrado hasta el momento en la implicación de otros tejidos en la modulación de esta proteína, y en especial en tejidos tan críticos para el desarrollo de enfermedades relacionadas con la acción de la insulina como el TA. Con los datos obtenidos en este estudio todavía es pronto para

establecer una relación más robusta entre el TAVo y la resistencia a insulina a través de la fetuina A, pero los datos preliminares son prometedores, por lo que se seguirá investigando esta relación en experimentos futuros.

4. Caracterización del secretoma de tejido muscular para la identificación de nuevas mioquinas

En la última década el estudio del tejido muscular esquelético ha suscitado un enorme interés en el mundo de la endocrinología con el descubrimiento de su capacidad para secretar una serie de factores a la circulación con efectos sobre la homeostasis energética denominados mioquinas [31, 114]. Debido a que la actividad física parece ser crucial para el mantenimiento de un estado saludable en el organismo, el interés por el estudio y caracterización de nuevas mioquinas va en aumento. Actualmente no existen dudas de que el ejercicio físico puede ejercer de factor protector frente a numerosas enfermedades crónicas como enfermedades cardiovasculares [258], obesidad [259], diabetes tipo 2 [260], osteoporosis [261], demencia [262], depresión [263] y cáncer [264]. Sin embargo, el conocimiento que se tiene hasta la fecha de las mioquinas descubiertas no ha servido todavía para explicar en mayor profundidad su papel en el efecto protector del ejercicio físico. Recientemente se ha dado un gran paso al respecto con la identificación de dos nuevas señales liberadas por el tejido muscular esquelético: la FNDC5/irisina [77] y la mionectina [172].

Bajo este contexto, y dada la evidente necesidad de profundizar en la identificación de nuevos actores en el mapa global de la secreción del tejido muscular, se propuso abordar este objetivo en este trabajo. Para ello se escogió la tecnología proteómica debido a que esta herramienta demostró ser muy útil en el estudio de caracterización realizado para el tejido adiposo. Hasta la fecha existían muy pocos trabajos que ahondara en el estudio de la secreción del tejido muscular esquelético utilizando para ello herramientas proteómicas. Sin profundizar demasiado, se pueden destacar estudios que han identificado nuevos componentes de la secreción de líneas celulares de músculo esquelético C2C12 y L6 durante su proceso de diferenciación [168, 171, 172], y la identificación de 18 proteínas nuevas secretadas por miotubos humanos aislados procedentes de biopsias [173].

4.1 Desarrollo de una metodología de cultivo de explantes para la identificación de proteínas secretadas por el tejido muscular esquelético.

Es bien conocido que el tejido muscular esquelético presenta una gran plasticidad molecular que le permite adaptarse rápidamente a estímulos tales como el ejercicio físico o la ausencia del mismo para optimizar su rendimiento, de forma que se producen cambios en su preferencia por una u otra fuente energética, así como en el tipo de catabolismo para la obtención de la misma. Estos cambios pueden ser puntuales cuando los estímulos duran un corto espacio de tiempo o continuados en el tiempo con el consecuente cambio en el tipo de fibras cuando los estímulos son de larga duración [105, 107, 108].

Para los distintos estudios proteómicos del secretoma de tejido muscular esquelético se escogieron los músculos sóleo y gastrocnemio por su diferente composición de fibras y su gran adaptabilidad a estímulos como el ejercicio físico [265]. Acorde a lo descrito en la bibliografía, se comprobó por inmunohistoquímica cómo el sóleo presentaba una mayoría de fibras del tipo I (oxidativas-lentas) y el gastrocnemio mayoría de fibras tipo II (glucolíticas-rápidas). También se observó que tras 6 días de ejercicio voluntario se alteró ligeramente el patrón de distribución de fibras, detectándose un incremento en el número de fibras tipo I en ambos tejidos.

El estudio en el que se basa este trabajo se centra en el análisis de la secreción de explantes de tejido muscular esquelético completos. Esta técnica, al igual que ocurría con el TA, tiene la desventaja de la posible presencia de contaminantes en los secretomas debido a la manipulación de las muestras o la rotura celular [237, 266], por lo que es necesario eliminar o minimizar en la medida de lo posible estos contaminantes, en especial los procedentes de la irrigación sanguínea. Para ello se optimizó el procesado del tejido muscular previo a su uso en base a la experiencia adquirida al trabajar con explantes de TA y a los estudios en la literatura de secretomas de cultivos celulares de tejido muscular [168], ya que no existían hasta la fecha protocolos para obtener secretomas de explantes completos de este tipo de tejido.

Así, la primera fase de este trabajo se basó en la optimización de las condiciones necesarias para el desarrollo por primera vez de una técnica para la obtención de la secreción de muestras de tejido muscular completas para su uso en posteriores estudios, tanto proteómicos como de caracterización por inmunodetección, ELISA, etc. Para ello se ensayaron diferentes protocolos de preparación de las condiciones de la muestra, como diferentes tipos de concentración y eliminado de sales, varios protocolos de precipitación de proteínas y diferentes tiempos de incubación de los explantes a fin de obtener la mejor resolución y número de manchas al realizar electroforesis bidimensional con los secretomas resultantes. Además se utilizó la

mioquina IL-6 como control interno de la viabilidad de los secretomas al ser una de las mioquinas más conocida y estudiada [109].

De la misma forma que se hizo en el estudio de la secreción de TA, las secuencias de todas las proteínas identificadas en este trabajo se analizaron mediante el software de predicción de proteínas secretadas *SecretomeP*, de manera que se pudieron clasificar en no secretadas o secretadas, y dentro de este grupo si presentan péptido señal u otro tipo de secreción no convencional [139, 186]. El 50% de las proteínas identificadas presentaban algún tipo de secreción tanto para los análisis realizados entre los músculos sóleo y gastrocnemio en condiciones *ad libitum*, como en los análisis individuales del secretoma de cada tejido comparando condiciones *ad libitum* frente a una semana de ejercicio voluntario, así como en los mapas 2D de referencia del secretoma de cada uno de estos músculos.

Bajo este contexto, se comprueba que la eficacia de la técnica desarrollada para detectar proteínas secretadas por el tejido muscular es limitada, ya que se identificaron proteínas intracelulares del músculo, en concreto proteínas contráctiles, citoplasmáticas y componentes del citoesqueleto, así como varias proteínas procedentes de estructuras subcelulares que pueden interferir en el análisis. Es destacable observar que la contaminación por distintos tipos de miosinas es más elevada en los secretomas de los animales que han sido sometidos a ejercicio voluntario. Para minimizar esta contaminación, se eligió un rango de pH más estrecho al realizar el isoelectroenfoque (pH 4-7) dejando fuera gran parte de las miosinas. Mediante el trabajo con líneas celulares o cultivos primarios de células procedentes del tejido muscular esquelético se podrían evitar algunos de estos problemas, sin embargo, el estudio de la secreción de explantes de tejido completo presenta una clara ventaja frente a estas metodologías, pues aporta un ambiente fisiológico más cercano al observado *in vivo*.

La presencia de contaminantes en la muestra de secretoma podría estar enmascarando importantes proteínas secretadas en bajas concentraciones. De esta forma, en este estudio no se detectaron mioquinas conocidas como varias interleuquinas, IGF-1, MMP-2 o miostatina [130, 131]. La ausencia de estas proteínas en el análisis puede explicarse de manera independiente a la presencia de contaminantes en la muestra, bien porque estas mioquinas han sido identificadas en otros estudios bajo diferentes técnicas metodológicas, porque la dinámica de secreción varíe dependiendo del tiempo de incubación, o porque estas proteínas presenten un punto isoeléctrico o peso molecular que se encuentre fuera del rango de análisis seleccionado para este estudio. Por ejemplo no se observó un incremento de IL-6 en los secretomas de tejido muscular procedentes del modelo de ejercicio, probablemente porque 6 días de ejercicio voluntario no es suficiente para detectar cambios en la secreción de IL-6. De hecho, como se demostró en el estudio posterior

de caracterización de la mioquina FNDC5/irisina, en los músculos procedentes de ratas sometidas a periodos de entrenamiento más elevados (3 semanas) sí detectamos un significativo incremento en la secreción de IL-6 [132].

4.2 Los músculos sóleo y gastrocnemio presentan diferencias en su perfil de secreción según la composición de fibras mayoritaria y el ejercicio físico.

En los mapas de referencia 2D del secretoma de ambos tipos musculares se identificaron proteínas específicas de músculo como las proteínas contráctiles miosina, actina, troponina o tropomiosina [267]; proteínas citoplasmáticas como varias isoformas de la enolasa, lactato deshidrogenasa y creatinina quinasa [268]; y componentes del citoesqueleto y varias estructuras subcelulares como la desmina, titina o la cristalina [269]. La mayor parte de las proteínas identificadas son proteínas ya conocidas y presentan una amplia distribución en el tejido muscular esquelético, puesto que para realizar el mapa de referencia tan sólo se identificaron las manchas más representativas, sin embargo durante los distintos análisis comparativos llevados a cabo, tan sólo se identificaron las proteínas que presentaban algún tipo de variación en su secreción, y que potencialmente serían más interesantes para estudios posteriores.

En los diferentes análisis proteómicos llevados a cabo en este trabajo para la caracterización de la secreción del tejido muscular esquelético, se identificaron proteínas comunes a otros estudios realizados en células L6 de rata en respuesta al tratamiento con insulina y TNF- α [168, 169]. En concreto la cadena A de la L-lactato deshidrogenasa, α -enolasa y la proteína A3 disulfuro isomerasa, moduladas en las células L6 en presencia de insulina; y también la proteína de unión a fosfatidiletanolamina, la isoforma 2 de la cadena beta de la tropomiosina, α -enolasa, proteína disulfuro isomerasa y la proteína DJ-1, moduladas por la acción de la TNF- α . Fue interesante observar que en los estudios diferenciales realizados, la α -enolasa era más abundante en el secretoma de gastrocnemio y que su secreción se encontraba aumentada en el sóleo tras 1 semana de ejercicio. Es complicado encontrar una correlación o una explicación fisiológica a estos resultados al compararlos con los estudios de Yoon y col., ya que los experimentos llevados a cabo por este grupo fueron realizados bajo un ambiente fisiológico pro-diabético. Por tanto deberían realizarse más estudios del secretoma de explantes de tejido muscular procedentes de animales obesos con resistencia a insulina o diabetes para aclarar la relación de estas enfermedades con las proteínas identificadas.

Además se identificaron proteínas de gran interés como la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, implicada en el metabolismo energético y lipídico, así como la alfa y

gamma enolasa, implicadas en la glucólisis; estas 3 proteínas se encontraron elevadas en el secretoma del gastrocnemio respecto al sóleo. Por otra parte, hay que destacar los altos niveles detectados de las proteínas aspartato aminotransferasa, asociada al metabolismo de aminoácidos, la enoil CoA hidratasa y la FABP-3, ambas relacionadas con el metabolismo lipídico, en el secretoma de músculo sóleo. Actualmente está ampliamente documentado que el tejido muscular es capaz de liberar enzimas citoplasmáticas, cuyos niveles plasmáticos pueden ser utilizados como marcadores del estado funcional del músculo y de sus condiciones fisiológicas y patológicas (por ejemplo el daño muscular producido por el ejercicio de gran intensidad) [270, 271]; por tanto será necesario en el futuro caracterizar el papel de estas enzimas metabólicas en el medio extracelular.

Precisamente, se sabe que la FABP-3 se expresa en grandes cantidades en el músculo, y recientemente se ha asociado la presencia de esta proteína en gastrocnemio con el desarrollo de obesidad y/o resistencia a insulina en ratones [272]. Concretamente, los experimentos realizados por este grupo con la línea celular de miotubos de ratón C2C12 mostraron que la FABP-3 estimulaba la captación de glucosa en el músculo a través de la fosforilación de la proteína AS160 dependiente de AMPK. También se ha descrito que los cardiomiocitos son capaces de liberar esta proteína al medio extracelular tras un infarto de miocardio [273]; y que esta proteína puede servir como marcador de toxicidad muscular en ratas [274]. Para validar la FABP-3 en este trabajo se estudió su presencia por inmunodetección, confirmando su elevación en los secretomas de sóleo frente a gastrocnemio, así como comprobando que aparecían niveles altos de esta proteína en los secretomas de gastrocnemio tras una semana de ejercicio. Los niveles altos de FABP-3 en el secretoma de sóleo, músculo caracterizado por una mayor presencia de fibras oxidativas-lentas, puede deberse a la participación de esta proteína en el metabolismo lipídico; mientras que su elevación en el gastrocnemio se puede explicar como respuesta al daño muscular producido por el ejercicio físico. Otra proteína de la misma familia, la FABP-2 (renombrada por la base de datos universal de proteínas Uniprot como aspartato aminotransferasa), también se encontró elevada en el secretoma de sóleo. Además de su implicación en el metabolismo de aminoácidos, de manera similar a la FABP-3, el nivel plasmático de esta proteína ha sido descrito como un potente marcador de daño muscular tras realizar ejercicio físico de gran intensidad [275].

La proteína DJ-1, que se encontró elevada en el secretoma de gastrocnemio, también se utilizó para validar este estudio de caracterización, confirmando los resultados obtenidos mediante técnicas proteómicas. A pesar de que la función de esta proteína todavía no se conoce muy bien, se ha relacionado con varias actividades celulares, incluyendo la transformación celular, control de interacciones proteína-ARN, respuesta al estrés oxidativo, control de la fertilidad masculina, actividad como chaperona o incluso en algunos casos con capacidades de actuar como proteasa [276].

En el tejido muscular esquelético, se ha relacionado recientemente con la regulación de la homeostasis del calcio [277]. La secreción de DJ-1 se ha encontrado en varios tipos celulares en cultivo, y también en varios tipos de cánceres [278, 279]; sin embargo, la secreción por parte del músculo no ha sido descrita hasta la fecha. La hipótesis de esta secreción se fundamenta en el posible papel de esta proteína en la respuesta al estrés oxidativo tras la contracción muscular. No existe hasta el momento una correlación directa entre los niveles de DJ-1 y la obesidad, sin embargo ratones knockout para esta proteína presentan una clara disminución de su peso corporal y un incremento en su fuerza de agarre [280]; además se ha encontrado elevada en el tejido adiposo de ratas resistentes a la obesidad [281]. De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, los niveles de expresión de DJ-1 se han encontrado claramente disminuidos en el músculo gastrocnemio procedente de ratas resistentes a la obesidad inducida por la dieta [282].

En resumen, este trabajo muestra el desarrollo de una nueva técnica para la obtención de la secreción directa de explantes completos de tejido muscular, gracias a la cual se ha realizado la primera caracterización del secretoma de tejido muscular esquelético (sóleo y gastrocnemio de rata) mediante técnicas proteómicas bajo condiciones *ad libitum* y ejercicio. Las proteínas identificadas en este trabajo, en especial las proteínas DJ-1 y la FABP-3, pueden considerarse potenciales mioquinas, pero será necesario en el futuro profundizar en la caracterización individual de cada una de ellas para un mayor conocimiento del papel que juegan en el organismo.

5. Caracterización de la hormona FNDC5/irisina.

A principios del 2012, Bostrom y col. identificaron la proteína FNDC5/irisina como una mioquina secretada por el tejido muscular esquelético en respuesta al ejercicio mediada por la activación del cofactor de transcripción PGC-1 α . Este grupo demostró que esta proteína era capaz de iniciar un fenómeno denominado *browning* mediante el cual algunas células del TAB adquirirían un fenotipo similar al de los adipocitos marrones. También sugirieron que la irisina podría mejorar la obesidad y la sensibilidad a insulina [77].

Este descubrimiento ha levantado en los últimos meses una gran expectación en el mundo científico, surgiendo numerosos comentarios en las revistas más punteras destacando este trabajo, así como demandando un mayor conocimiento e investigación futura sobre esta proteína, su papel en el fenómeno de *browning* y sus efectos fisiológicos [121-124, 190, 283].

A pesar de que el grupo de Spiegelman en su trabajo describen tanto el descubrimiento de la nueva mioquina FNDC5/irisina como de su posible función,

ciertos aspectos referentes a esta nueva hormona todavía siguen sin ser aclarados [77]. Este grupo considera que la proteína FNDC5 se sintetiza como una proteína de membrana del tipo I que puede escindirse proteolíticamente liberando al medio extracelular un pequeño péptido (porción aminoterminal) de 12 kDa que denominaron irisina, al que se le atribuye las funciones de esta nueva hormona. Para demostrar la presencia de este péptido en el plasma y medio extracelular, sin embargo utilizaron un anticuerpo dirigido hacia la región C-terminal no secretada de la proteína (aminoácidos 149-178). Mediante este anticuerpo, Bostrom y col. detectaron por inmunodetección elevados niveles de FNDC5 en el medio de cultivo procedente de células HEK 293 transfectadas con un vector que expresa FNDC5 marcado en la región C-terminal; la banda detectada aparecía a un peso molecular de alrededor de 32 kDa, peso atribuido a la intensa glucosilación que sufre esta proteína en el medio extracelular. Por otro lado, la FNDC5 observada en el secretoma no presentaba el marcaje C-terminal, con lo que se dedujo que lo que se estaba detectando era la fracción N-terminal, irisina. Este anticuerpo frente a la región C-terminal también fue utilizado para detectar dicha proteína en plasma de ratones cuyo hígado había sido forzado a sobreexpresar la forma completa de FNDC5 mediante infección con adenovirus. En estos animales encontraron concentraciones significativas de esta mioquina a un peso molecular de 22 kDa tras realizar una deglucosilación de la muestra.

Estas evidencias sugieren que la forma completa de la FNDC5/irisina también se secreta, como recientemente se ha apuntado en la base de datos universal de proteínas Uniprot (UniprotKB Ref. Q8NAU1).

5.1 La FNDC5/irisina como mioquina

5.1.1 Validación de las muestras para su análisis e identificación de la banda de inmunodetección perteneciente a FNDC5/irisina

Dada la gran expectación generada a partir de la identificación de la FNDC5/irisina y tomando como punto de partida la experiencia adquirida en trabajos anteriores para el estudio de la secreción del tejido muscular esquelético, se propuso caracterizar esta proteína bajo diferentes condiciones fisiológicas y patológicas; así como ahondar en la identificación del fragmento que realmente se está secretando a partir de esta proteína.

Para establecer si se estaba secretando la proteína completa FNDC5 o tan sólo el fragmento de 12 kDa irisina, los experimentos de inmunodetección se realizaron en paralelo mediante el uso de dos anticuerpos dirigidos a regiones distintas de la proteína, un anticuerpo que reconoce la región C-terminal teóricamente no secretada (aminoácidos 149-178) y otro anticuerpo frente una región próxima a la zona N-terminal que corresponde a la teórica irisina (aminoácidos 42-112). De acuerdo con los

resultados aportados por el grupo de Spiegelman, en el secretoma de músculo se detectó una clara banda predominante de 25 kDa utilizando ambos anticuerpos, así como una serie de bandas extra debidas probablemente a glicosilaciones, especialmente al usar el anticuerpo que reconoce únicamente irisina. Este anticuerpo también mostró una tenue banda de aproximadamente 12 kDa que no pudo ser cuantificada, por lo que se analizó la banda de 25 kDa en subsiguientes experimentos.

Para analizar los niveles de FNDC5/irisina en el suero se optó por la inmunodetección en lugar de técnicas comúnmente utilizadas para este tipo de análisis como el ELISA, debido a que los kits de ELISA existentes en el momento de la realización de los experimentos no ofrecían resultados reproducibles y además se observó una gran variabilidad en los niveles detectados para muestras poblacionales similares en la bibliografía [125-127]. En el caso de los niveles séricos, se observó al igual que en los secretomas una banda predominante de 25 kDa así como una serie de bandas de mayor peso molecular debidas a diferentes grados de glicosilación. En base a estos datos, hasta la fecha todavía no se ha demostrado la secreción directa de la forma de 12 kDa de irisina tanto por parte del tejido muscular como de cualquier otro tejido.

Con respecto al diseño experimental escogido para la caracterización de esta proteína, al igual que ocurrió con el estudio anterior del secretoma de tejido muscular, se puede argumentar que en estos secretomas pueden aparecer contaminantes o proteínas no esperadas (por ejemplo proteínas intracelulares) [236-238]. Esto ha sido discutido de una forma más amplia en secciones anteriores de este trabajo, pero se puede concluir que si bien la presencia de estos contaminantes en cierta medida es inevitable, a lo largo de los estudios realizados con los secretomas se ha observado que estos contaminantes están presentes de forma constante sin observarse variaciones según el origen fisiológico o patológico de la muestra, por lo que es relativamente sencillo detectar si la proteína identificada es fruto de una contaminación o si realmente está siendo secretada. Los datos comparativos entre los niveles de FNDC5/irisina observados en este trabajo con los datos aportados por Bostrom y col. son lo suficientemente robustos como para considerar que la banda de 25 kDa detectada corresponde a la proteína FNDC5/irisina liberada de forma activa por el tejido muscular esquelético al medio extracelular.

5.1.2 La secreción y expresión de FNDC5/irisina en el tejido muscular esquelético se ve afectada por la restricción calórica y por el ejercicio.

Para la caracterización de la secreción y expresión de la mioquina FNDC5/irisina se combinó la experiencia adquirida en anteriores trabajos con respecto al establecimiento de modelos animales bajo distintas condiciones fisiológicas y

patológicas con el desarrollo de una nueva técnica para la obtención de la secreción directa procedente de explantes completos de tejido muscular esquelético.

Los niveles de FNDC5/irisina detectados en los secretomas de los músculos sóleo y gastrocnemio fueron acordes con los resultados publicados por Bostrom y col. [77], observando un claro incremento tras tres semanas de ejercicio voluntario, sin embargo parece que una semana de ejercicio no es suficiente para detectar diferencias significativas en sus niveles. Paralelamente se analizaron los niveles de expresión de ARNm de PGC1- α sin observar diferencias en ambos tejidos durante el ejercicio, al igual que se ha observado en anteriores trabajos [284]. Sin embargo este hecho no debería ser indicativo de una regulación independiente a PGC1- α de la FNDC5/irisina, puesto que los niveles de PGC1- α presentan un formato de expresión aguda y tienden a normalizarse tras 3 horas de haber finalizado un programa de ejercicio físico [285]. En condiciones *ad libitum* el músculo sóleo oxidativo-lento secreta aproximadamente un 40% más FNDC5/irisina que el músculo gastrocnemio glucolítico-rápido, diferencias que se mantienen proporcionalmente en el resto de modelos, indicando la existencia de una importante relación entre la FNDC5/irisina y el catabolismo de ácidos grasos a través de la PGC1- α , relacionada directamente con la biogénesis mitocondrial y la adaptación del tejido muscular esquelético a la oxidación de ácidos grasos [116, 284].

Durante el ayuno el tipo de fibras mayoritario del músculo es determinante a la hora de observar el patrón de secreción de esta proteína. Mientras que en el músculo sóleo se incrementan los niveles de FNDC5/irisina, en el gastrocnemio ocurre lo contrario tanto para su secreción como su expresión intracelular. Este efecto puede justificarse por la mayor capacidad del músculo sóleo para la utilización de ácidos grasos como fuente de energía [265] por lo que este músculo tendría una mayor necesidad de que se produzca una movilización de ácidos grasos a la circulación durante periodos de ayuno [286, 287]. Así la FNDC5/irisina podría estar relacionada con la regulación de ácidos grasos dependiente o incluso independientemente al fenómeno de *browning* que produce en el tejido adiposo [77, 78]. De acuerdo a esto, tras el ayuno, 15 minutos de realimentación son suficientes para invertir el patrón de secreción en ambos músculos.

5.1.3 La secreción y expresión de FNDC5/irisina en el tejido muscular esquelético también se encuentra alterada en situaciones patológicas.

En el caso del particular tipo de ayuno del control del modelo ABA, durante el cual los animales tienen acceso a la comida tan sólo una hora al día, ambos músculos presentan un perfil de secreción aumentado con respecto a animales en condiciones *ad libitum*, en especial el músculo gastrocnemio. En la bibliografía está bien documentado que la dieta y el ayuno prolongado afecta a la plasticidad muscular

reduciéndose la proporción de fibras tipo II (glucolíticas-rápidas) en favor de una mayor cantidad de fibras tipo I (oxidativas-lentas) [288, 289], siendo los músculos con mayor proporción de fibras tipo I, como el sóleo, los que más contribuyen a los niveles secretados de FNDC5/irisina. Sin embargo dicho perfil no se mantiene al observar los niveles de proteína intracelular, donde se detecta una clara disminución en el gastrocnemio, posiblemente debida a que la mayor parte de la FNDC5 producida se está secretando. Con respecto a los niveles de ARNm no se observa una correlación con los niveles de proteína intracelular o secretada, esto se explica porque si bien se suele asumir que los niveles de ARNm son predictivos de los niveles de expresión proteica; es importante destacar que la correlación entre ambos factores ha sido descrita como moderada o ligeramente positiva (con unos coeficientes de correlación que van de un rango 0.2 a 0.6), en especial al tratarse de proteínas secretadas [290, 291].

Uno de los aspectos que el grupo de Spiegelman no ha tratado con la profundidad suficiente como para asegurar en su trabajo que la FNDC5/irisina podría tener un uso terapéutico directo para el tratamiento de la obesidad y enfermedades relacionadas [77, 292], es comprobar que ocurre con los niveles secretados de esta proteína en condiciones de obesidad. En nuestro trabajo se muestra por primera vez qué ocurre en el músculo en estas condiciones analizando muestras procedentes de animales sometidos a una dieta alta en grasa durante 10 semanas y de animales Zucker obesos (fa/fa). Sorprendentemente en el modelo DIO, ambos músculos presentan una tasa de secreción y expresión de FNDC5/irisina superior a sus controles, especialmente el músculo que más participa en los niveles secretados a la circulación como es el sóleo. Estos resultados han sido apoyados en trabajos recientes, incluyendo estudios previos no publicados de nuestro grupo en el que se han detectado niveles circulantes elevados de esta proteína en pacientes obesos en comparación con individuos normopeso [126, 293].

Con respecto a los músculos procedentes de ratas Zucker, mientras que en gastrocnemio se mantiene la tendencia e incluso se incrementan los niveles de FNDC5/irisina secretada, en el caso del sóleo se observa una clara disminución en su secreción, probablemente debido a algún tipo de relación entre la FNDC5/irisina y los receptores de leptina, o algún tipo de proceso relacionado con su señalización [294]. Debido a la presencia de receptores de leptina en el músculo esquelético, tejido que incluso produce y libera esta hormona al medio extracelular [295], este efecto necesitará de una mayor investigación en el futuro. Al observar los niveles circulantes de FNDC5/irisina en este modelo, parece que esta disminución en el sóleo está afectando de la misma manera a los niveles globales de la proteína.

5.2 FNDC5/irisina como adipoquina

5.2.1 El tejido adiposo blanco también secreta FNDC5/irisina.

Durante el transcurso del trabajo de caracterización de la expresión y secreción de FNDC5/irisina por parte del tejido muscular esquelético en esta tesis doctoral, se descubrió por primera vez que el tejido adiposo también es capaz de expresar y secretar esta proteína. Se siguió una estrategia similar a la realizada con el músculo esquelético observando que en el TA también aparecía una banda mayoritaria de 25 kDa tanto en el secretoma del TAVo como en el TAS. Los resultados obtenidos para la secreción de FNDC5/irisina por parte del TA han sido confirmados mediante la medición de proteína celular y ARNm en todos los modelos investigados, así como su caracterización en adipocitos y en tejido adiposo humano.

Dado el importante papel en la homeostasis energética del TA y su participación en la obesidad [296, 297], el descubrimiento y caracterización de la FNDC5/irisina como nueva adipoquina descrita en este trabajo, sugiere un efecto autocrino/paracrino y más probablemente una función endocrina de este péptido en el TA. Por tanto, dado que se ha atribuido al músculo el 72% de la FNDC5/irisina circulante [77], el TA podría estar participando en el restante 28% en situaciones fisiológicas normales. De acuerdo a las conclusiones resultantes del anterior trabajo de caracterización por proteómica del tejido adiposo, la FNDC5/irisina muestra un patrón distinto de secreción y expresión dependiendo de la localización anatómica del TA. En base a esto, el hecho de que el TAS secrete mucha más cantidad de FNDC5/irisina que otros depósitos de TA es algo esperado atendiendo al atribuido efecto beneficioso de este depósito en comparación con el TAV, el cual presenta una participación activa en las complicaciones metabólicas asociadas a la ganancia de peso y obesidad [241, 298].

5.2.2 La secreción y expresión de FNDC5/irisina en el tejido adiposo está modulada por el ejercicio y el estado nutricional, así como en situaciones patológicas.

En relación con el ejercicio, es interesante observar el patrón temprano de secreción de FNDC5/irisina en el TA comparado con la secreción a partir del músculo. Los resultados obtenidos indican que el TAB incrementa la secreción de esta proteína tras periodos cortos de ejercicio voluntario (una semana), mientras que tras 3 semanas de ejercicio se produce una marcada disminución en sus niveles, coincidiendo con el pico de secreción observado en el secretoma del tejido muscular y justificando el pico observado a una semana de ejercicio en las muestras de suero. Es necesario todavía investigar en mayor profundidad el papel de la FNDC5/irisina del TA para responder muchas incógnitas, sin embargo, si esta proteína es capaz de dirigir la conversión de TAB en TAP como indica el grupo de Spiegelman [77, 78, 292], parece que al TAB no le

interesa estimular el consumo energético a través de la termogénesis durante el ejercicio prolongado. Consecuentemente, se observó que 36 horas de ayuno reducen los niveles de FNDC5/irisina secretada por el TAB, así como también durante el especial régimen al que se ven sometidos los animales del grupo control ABA, en especial en el TAVo. Como se comenta en la sección anterior, y observando los niveles circulantes de FNDC5/irisina, parece que los músculos con mayoría de fibras tipo I son los responsables de los valores circulantes elevados durante el ayuno.

Se analizó el posible efecto de *browning* sobre el TAB mediante la inmunodetección de la proteína específica de TAP UCP-1, responsable de la termogénesis no tiritante en adipocitos marrones [299]. De manera inesperada se detectó expresión de UCP-1 en el TAVo procedente de animales anoréxicos y sus controles, así como en los animales sometidos a una semana de ejercicio. La expresión de UCP-1 en estos casos fue paralela a los niveles circulantes de FNDC5/irisina observados. Aún más interesante fue comprobar que esta expresión desaparecía tras 3 semanas de ejercicio, momento en el que los niveles de FNDC5/irisina se reducen en el TAB. A este respecto, Bostrom y col. describen en su trabajo un gran porcentaje de *browning* en el TAS y, en menor medida, en el TAV tras someter a ratones a 3 semanas de ejercicio voluntario [77]. Sin embargo los resultados de este trabajo con respecto al TAVo no son comparables a los del grupo de Spiegelman, ya que estos autores utilizan TA procedente del epidídimo como TAV, mientras que para este estudio se ha utilizado TAVo localizado dentro de la cavidad peritoneal rodeando a los órganos internos, TA que se asemeja más al TAV humano situado en las proximidades del hígado. Además, en el anterior trabajo de caracterización por proteómica de la secreción del TA, se ha demostrado que el TAVg de rata muestra un patrón de secreción proteico distinto al observado para el TAVo y se le ha atribuido un papel relacionado con la función reproductora [83].

En el trabajo de Bostrom y col. muestran que la expresión forzada en el hígado de FNDC5 y el consecuente incremento de los niveles circulantes de FNDC5/irisina, mejoran significativamente la tolerancia a la glucosa y reducen los niveles de insulina en ayuno en ratones obesos e insulino-resistentes [77]. En este estudio sin embargo, detectamos niveles muy elevados de FNDC5/irisina en el TAB de animales obesos. Los datos tanto de la secreción directa del tejido muscular como de los niveles circulantes de esta proteína en el suero confirman este hecho, sugiriendo que los animales expuestos en el tiempo a altas concentraciones de FNDC5/irisina circulante podrían desarrollar algún tipo de resistencia a esta proteína. Si esta hipótesis es correcta, el incuestionable papel del tejido muscular en los efectos beneficiosos aportados por el ejercicio necesitará ser explicado a través de mecanismos alternativos a la secreción de FNDC5/irisina.

Globalmente, esta proteína muestra unos patrones de secreción similares a otras adipocinas bien caracterizadas (como la leptina), por tanto los resultados obtenidos

con esta caracterización sugieren un patrón de retroalimentación por el cual el TA muestra una clara sensibilidad a los niveles circulantes de FNDC5/irisina. La necesidad del TA de preservar su función como reservorio energético para el mantenimiento de la homeostasis energética del organismo, podría justificar por qué se produce una disminución en los niveles de secreción de FNDC5/irisina en el TA cuando sus niveles circulantes se encuentran más elevados. Bajo estas circunstancias, la resistencia a FNDC5/irisina podría explicar los altos niveles de secreción observados en el TA de animales DIO; sin embargo será necesario realizar más investigaciones para confirmar esta hipótesis.

El reciente trabajo de Stengel y col. ha aportado importantes datos que podrían ayudar a comprender aún más el papel de la FNDC5/irisina secretada por el TA [126]. Este grupo ha observado altos niveles circulantes de esta proteína en pacientes obesos comparados con pacientes con anorexia y personas normopeso, estableciendo una clara correlación entre los niveles circulantes de FNDC5/irisina con el peso corporal, la masa grasa y otros marcadores de adiposidad. Estos datos y trabajos muy recientes de nuestro grupo sugieren que los niveles circulantes de esta proteína están afectados en condiciones de IMC alterados [293]. Tomando como partida estos resultados y comparándolos con los obtenidos en este trabajo, se puede postular que el ratio de secreción músculo/TA de FNDC5/irisina podría variar según la situación fisiológica. Por tanto, con el ejercicio físico, el tejido muscular estaría afectando en gran medida a los niveles circulantes de esta proteína; mientras que en condiciones de IMC alterado como en obesidad, la secreción activa de FNDC5/irisina estaría a cargo del TA.

Los resultados obtenidos en este trabajo de caracterización de la FNDC5/irisina como mioquina-adipoquina asientan las bases para futuras investigaciones, pues quedan todavía muchas preguntas sin respuesta con respecto a la FNDC5/irisina, así como a la naturaleza de su receptor (todavía no conocido) y a las funciones concretas tanto de la forma larga como corta de FNDC5/irisina.

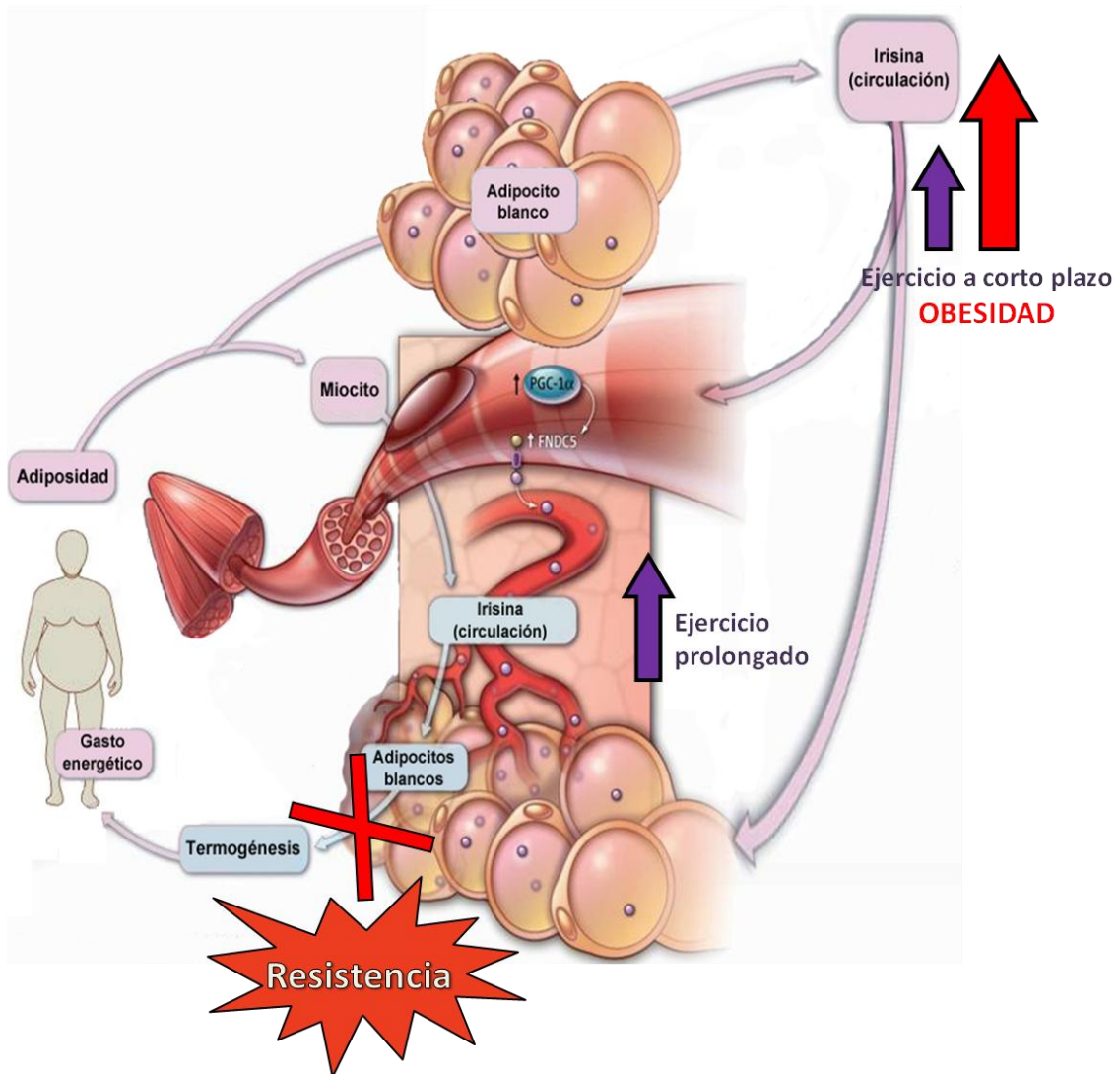


Figura 92: Esquema del modelo propuesto para la secreción de FND5/irisina basado en los resultados del estudio realizado en esta tesis doctoral. El tejido muscular esquelético sería el mayor responsable de la producción y secreción de FND5/irisina en condiciones basales y durante periodos de ejercicio prolongado. Por el contrario, el tejido adiposo blanco sería el principal responsable de la secreción de FND5 en periodos de ejercicio a corto plazo y, en mayor medida, en situaciones de IMC elevados pudiendo existir en este contexto algún tipo de resistencia a la acción de esta proteína. Modificado de [32, 124].

VI. Conclusiones

1. La caracterización del modelo experimental de anorexia por actividad (ABA) indica que es un buen modelo para estudiar dicha enfermedad a nivel endocrino y se postula como una situación opuesta a la obesidad para futuros estudios.
2. En la caracterización del modelo ABA se confirma que la restricción calórica a 1 hora por día (CABA), y particularmente, la combinación de esta restricción con el ejercicio (ABA), disminuye significativamente la masa grasa y los niveles circulantes de leptina, aumenta los niveles circulantes de ghrelina y aumenta la sensibilidad a insulina.
3. En estudios de secreción directa *in vitro* se observa que el tejido adiposo visceral y gonadal participan más que el subcutáneo en la hipoleptinemia de ABA.
4. En los modelos animales establecidos, el estudio de los receptores de ghrelina (GHS-R1a) y leptina (LEPR) a nivel periférico muestran un patrón de expresión dependiente del tipo de tejido. Así el tejido muscular esquelético de tipo oxidativo parece ser más susceptible a los niveles de ghrelina y leptina circulantes que el de tipo glicolítico en situaciones de ejercicio y restricción calórica. En cuanto al tejido adiposo, la hiperghrelinemia crónica induce la expresión de GHS-R1a en el tejido adiposo visceral y subcutáneo sugiriendo una prevención en la pérdida de lípidos. Por otro lado sólo el tejido adiposo subcutáneo expresó la forma larga activa de LEPR en situaciones de hipoleptinemia en ABA.
5. El análisis por electroforesis bidimensional permitió establecer por primera vez mapas representativos de secreción del tejido adiposo subcutáneo, visceral-omental y gonadal en condiciones basales *ad libitum*, y la identificación de las proteínas más representativas.
6. El análisis diferencial entre los tres tipos de tejido adiposo permite comprobar un patrón de secreción característico de cada depósito en función de su localización anatómica, e identificar 45 proteínas diferencialmente secretadas entre los tres tejidos.
7. El estudio proteómico permitió la identificación de proteínas previamente asociadas al tejido adiposo como la adiponectina y otras proteínas nunca antes relacionadas, como la galectina-1 elevada en el secretoma procedente del tejido adiposo de tipo visceral-omental y gonadal.

8. El estudio del secretoma del tejido adiposo permitió la identificación y caracterización por primera vez de la proteína fetuina A como nueva adipocina secretada directamente por los adipocitos del tejido adiposo, pudiendo contribuir en los niveles circulantes de esta proteína. Los resultados obtenidos otorgan una mayor importancia al tejido adiposo visceral en la secreción de fetuina A respecto al subcutáneo, e indican una sobre-secreción en situaciones de obesidad. Dada la capacidad de la fetuina A para inhibir el receptor de insulina, se sugiere la participación del tejido adiposo obeso en la resistencia a la insulina a través de la secreción de fetuina A.

9. La puesta a punto de un modelo de secreción directa a partir de explantes de tejido muscular esquelético permitió mediante técnicas proteómicas el establecimiento por primera vez de mapas representativos de secreción y su caracterización en condiciones basales *ad libitum*, y tras la intervención con ejercicio.

10. El estudio proteómico mostró un perfil de secreción diferencial entre tejidos musculares de tipo oxidativo y glicolítico, y un cambio en el patrón de secreción tras el ejercicio. En concreto se encontraron 19 proteínas diferentes entre los secretomas de ambos tejidos en condiciones basales, y 17 y 10 proteínas en los músculos oxidativos y glicolíticos respectivamente al comparar la situación basal con una semana de ejercicio.

11. Entre las proteínas identificadas en el estudio proteómico del tejido muscular se encontró la proteína DJ-1, más abundante en el músculo de tipo glicolítico; y la proteína FABP-3 que se encontró elevada en el oxidativo. Estas y otras proteínas identificadas podrían ser consideradas potenciales mioquinas.

12. La proteómica se define como una herramienta útil para el estudio de la secreción directa o secretomas a partir de explantes completos de tejido adiposo y muscular esquelético; así como imprescindible para mejorar el conocimiento sobre la patogénesis molecular de la obesidad y enfermedades relacionadas.

13. La caracterización de la mioquina recién descubierta FNDC5/irisina en esta tesis confirmó como el tejido muscular esquelético expresa y secreta FNDC5/irisina y como sus niveles de secreción vienen determinados por el tipo de fibras que lo componen. Así, se observó que los músculos de tipo oxidativo secretan mayores niveles de esta mioquina que los de tipo glicolítico.
14. Este trabajo también permitió descubrir por primera vez que el tejido adiposo blanco también expresa y secreta FNDC5/irisina, siendo el tejido adiposo subcutáneo el depósito que más participa en su secreción.
15. La secreción y expresión de FNDC5/irisina en el tejido adiposo y el tejido muscular esquelético se encuentra modulada por el ejercicio y el estado nutricional, así como en situaciones patológicas.
16. Finalmente se observa que los niveles de secreción y circulantes de FNDC5/irisina se encuentran elevados en situaciones de obesidad sugiriendo una resistencia a la misma.

VII. Apéndice

Secretoma de TAVo (1 de 4)

Número de mancha	SecretomeP2.0	Nombre de la proteína	Código Uniprot
177, 178	0.156	Proteasome subunit alpha type-4	PSA4_RAT
6, 9	0.161	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	TERA_RAT
169, 138	0.212	Pyridoxal phosphate phosphatase	PLPP_RAT
1, 2, 10, 11	0.215	Vinculin	VINC_RAT
188, 189	0.227	Proteasome subunit alpha type-7	PSA7_RAT
47, 94, 106, 107, 109	0.229	Heat shock cognate 71 kDa protein	HSP7C_RAT
3, 4, 20	0.243	Spectrin alpha chain, brain	SPTA2_RAT
183	0.246	Proteasome subunit alpha type-3	PSA3_RAT
47, 109, 282, 294	0.259	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B	HSP71_RAT
68	0.285	Beta-enolase	ENOB_RAT
182	0.300	Phospholysine phosphohistidine inorganic	LHPP_RAT
246	0.304	Magnesium-dependent phosphatase 1	MGDP1_MOUSE
243, 254, 262, 283, 290, 303, 304	0.306	Nucleoside diphosphate kinase B	NDKB_RAT
190, 215	0.309	Glutathione S-transferase alpha-3	GSTA3_RAT
82	0.310	Rab GDP dissociation inhibitor beta	GDIB_RAT
45	0.320	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	CH60_RAT
264, 266	0.324	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	PPIA_RAT
161	0.330	14-3-3 protein epsilon	1433E_RAT
208, 209, 231	0.331	Proteasome subunit alpha type-2	PSA2_RAT
106	0.340	Aminoacylase-1A	ACY1A_RAT
243, 248, 249, 254, 303, 304	0.343	Nucleoside diphosphate kinase A	NDKA_RAT
220	0.350	Heme-binding protein 1	HEBP1_MOUSE
15, 52, 147, 177, 185, 187, 188, 196, 207	0.353	Carbonic anhydrase 3	CAH3_RAT
201	0.353	Cathepsin S	CATS_RAT
114, 115, 97	0.357	Fructose-bisphosphate aldolase A	ALDOA_RAT
24	0.359	Pyruvate carboxylase, mitochondrial	PYC_RAT
102	0.362	Adenosine deaminase	ADA_RAT
37-40, 42, 71	0.370	Catalase	CATA_RAT
48, 49	0.378	Cytosol aminopeptidase	AMPL_RAT
184, 192	0.380	Isoamyl acetate-hydrolyzing esterase 1 homolog	IAH1_RAT
201	0.384	Glutathione S-transferase A6	GSTA6_RAT
213	0.385	AP-1 complex subunit beta-1	AP1B1_RAT
84	0.392	Acyl-coenzyme A thioesterase 2, mitochondrial	ACOT2_RAT
15	0.400	Aconitate hydratase, mitochondrial	ACON_RAT
85, 86	0.400	Phosphoglycerate kinase 1	PGK1_RAT
129, 141, 143-145	0.400	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	MDHC_RAT
205, 240	0.401	Proteasome subunit beta type-3	PSB3_RAT
111, 112, 118, 121	0.404	Transaldolase	TALDO_RAT
148, 149, 157, 292	0.405	Aldose reductase	ALDR_RAT
194-196, 230	0.408	Phosphoglycerate mutase 1	PGAM1_RAT
214	0.411	Proteasome subunit beta type-1	PSB1_RAT
32, 59	0.413	Alpha-actinin-4	ACTN4_RAT
235, 258, 269	0.415	Coactosin-like protein	COTL1_RAT
43	0.416	NADP-dependent malic enzyme	MAOX_RAT
46	0.416	Dihydropyrimidinase-related protein 2	DPYL2_RAT
204	0.416	Triosephosphate isomerase	TPIS_RAT
32	0.421	Alpha-actinin-1	ACTN1_RAT
248	0.421	Elongation factor 1-gamma	EF1G_RAT
249	0.421	Elongation factor 1-gamma	EF1G_RAT
174	0.425	Proteasome subunit alpha type-1	PSA1_RAT

(Continúa en la página siguiente)

Secretoma de TAVo (2 de 4)

Número de mancha	SecretomeP2.0	Nombre de la proteína	Código Uniprot
27, 112, 114, 122, 260, 270	0.427	Transketolase	TKT_RAT
262	0.427	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	GDIR1_RAT
210, 232	0.427	Proteasome subunit beta type-2	PSB2_RAT
193, 229	0.429	Proteasome subunit alpha type-6	PSA6_RAT
151	0.432	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase	HCDH_RAT
162	0.434	Annexin A5	ANXA5_RAT
288, 289, 297-299, 301, 302	0.436	Hemoglobin subunit beta-2	HBB2_RAT
181	0.442	Inositol monophosphatase	IMPA1_RAT
239, 252, 247, 253	0.444	Rho GDP-dissociation inhibitor 2	GDIR2_MOUSE
276, 277, 286, 307	0.444	Fatty acid-binding protein, epidermal	FABP5_RAT
227	0.446	Ferritin light chain 1	FRIL1_RAT
142	0.447	Aldose 1-epimerase	GALM_RAT
126	0.454	F-actin-capping protein subunit alpha-2	CAZA2_RAT
219	0.455	COP9 signalosome complex subunit 8	CSN8_RAT
296, 319	0.456	D-dopachrome decarboxylase	DOPD_RAT
134, 135	0.456	Malate dehydrogenase, mitochondrial	MDHM_RAT
157	0.460	Phosphatidylinositol transfer protein alpha isoform	PIPNA_RAT
63	0.461	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	DHE3_RAT
288, 289, 295, 297-299, 301, 302, 307	0.462	Hemoglobin subunit beta-1	HBB1_RAT
152, 326	0.464	Filamin-A	FLNA_MOUSE
179, 191	0.465	Proteasome subunit alpha type-5	PSA5_RAT
130	0.472	N-acetylneuraminase lyase	NPL_RAT
271	0.472	Thioredoxin-like protein 1 ^[25]	TXNL1_RAT
153, 126	0.480	F-actin-capping protein subunit alpha-1	CAZA1_RAT
170	0.484	Haloacid dehalogenase-like hydrolase	HDHD2_RAT
222	0.484	Proteasome subunit beta type-8	PSB8_RAT
161	0.488	Tropomyosin alpha-4 chain	TPM4_RAT
152	0.496	Phosphoglycolate phosphatase	PGP_MOUSE
72-74	0.501	Fumarate hydratase, mitochondrial	FUMH_RAT
92	0.504	Actin, alpha cardiac muscle 1	ACTC_RAT
105, 108	0.507	Leukocyte elastase inhibitor A	ILEUA_RAT
147	0.507	Glutathione S-transferase omega-1	GSTO1_RAT
87	0.508	3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial	THIM_RAT
56, 257	0.510	Plastin-2	PLSL_MOUSE
93	0.512	Adenosylhomocysteinase	SAHH_RAT
92, 155, 164, 200	0.512	Actin, gamma-enteric smooth muscle	ACTH_RAT
118, 148, 159, 173, 175	0.514	Purine nucleoside phosphorylase	PNPH_RAT
83	0.520	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial	IDHP_RAT
160	0.527	WD repeat-containing protein 1	WDR1_RAT
198	0.527	Translationally-controlled tumor protein	TCTP_RAT
285	0.529	Cystatin-B	CYTB_RAT
61, 65, 68, 82	0.533	Alpha-enolase	ENOA_RAT
204	0.537	Protein DJ-1	PARK7_RAT
61, 62	0.540	Selenium-binding protein 1	SBP1_RAT
259	0.540	Histone H2A type 1-E	H2A1E_RAT
156, 158	0.546	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD+],	GPDA_RAT
176	0.549	Nitrilase homolog 2	NIT2_RAT
216, 217	0.555	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	SODM_RAT
323, 324	0.555	10 kDa heat shock protein, mitochondrial	CH10_RAT
289	0.560	Profilin-1	PROF1_RAT

(Continúa en la página siguiente)

Secretoma de TAVo (3 de 4)

Número de mancha	SecretomeP 2.0	Nombre de la proteína	Código Uniprot
218, 281, 293	0.562	Peroxiredoxin-2	PRDX2_RAT
128, 139, 140	0.568	L-lactate dehydrogenase B chain	LDHB_RAT
202	0.568	Proteasome subunit beta type-4	PSB4_RAT
171	0.570	Nitrilase homolog 1	NIT1_RAT
259	0.572	Histone H2A.J	H2AJ_RAT
83, 84	0.573	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	IDHC_RAT
134	0.575	L-lactate dehydrogenase A chain	LDHA_RAT
199	0.579	Proteasome subunit beta type-6	PSB6_RAT
85	0.582	Citrate synthase, mitochondrial	CISY_RAT
182	0.583	F-actin-capping protein subunit beta	CAPZB_RAT
268	0.587	Griffin	GRIFN_RAT
127, 236	0.589	Keratin, type I cytoskeletal 10	K1C10_RAT
50, 51	0.591	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial	DLDH_RAT
297	0.593	Ribonuclease UK114	UK114_RAT
75, 89	0.595	Ribonuclease inhibitor	RINI_RAT
76	0.598	Gamma-enolase	ENOG_RAT
211, 306, 311, 318, 320	0.598	Peroxiredoxin-1	PRDX1_RAT
90	0.601	Vimentin ^[25]	VIME_RAT
146	0.612	Pyridoxal kinase	PDXK_RAT
255,298,299, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 321	0.612	Hemoglobin subunit alpha-1/2	HBA_RAT
95	0.616	Fumarylacetoacetase	FAAA_RAT
67	0.617	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	ATPB_RAT
162	0.620	Enolase-phosphatase E1	ENOPH_RAT
112	0.623	3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase, mitochondrial	HIBCH_RAT
224, 237	0.623	Ferritin heavy chain	FRIH_RAT
290, 291	0.625	Nuclear transport factor 2	NTF2_RAT
60	0.627	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	ALDH2_RAT
255	0.628	Cofilin-1	COF1_RAT
242, 241, 274	0.628	Transgelin	TAGL_RAT
165	0.634	Aspartoacylase-2	ACY3_RAT
172	0.639	3-mercaptopyruvate sulfurtransferase	THTM_RAT
162, 167, 168	0.644	Glyoxalase domain-containing protein 4	GLSD4_RAT
223, 234	0.650	Proteasome subunit beta type-9	PSB9_RAT
201, 221	0.657	Abhydrolase domain-containing protein 14B	ABHEB_RAT
90	0.665	Desmin	DESM_RAT
131,15	0.674	Fumarylacetoacetate hydrolase domain-containing	FAHD2_RAT
244, 256	0.676	Calmodulin	CALM_RAT
128	0.680	3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase 1	BPNT1_RAT
99	0.689	Keratin, type I cytoskeletal 17	K1C17_RAT
328, 330, 331, 335	0.693	Ubiquitin	UBIQ_CRIGR
280	0.698	Thioredoxin	THIO_RAT
327, 329, 332	0.700	Histone H3.3	H33_RAT
99	0.705	Keratin, type I cytoskeletal 19	K1C19_RAT
309	0.706	Macrophage migration inhibitory factor ^[25]	MIF_RAT
250, 251, 261, 274	0.728	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	SODC_RAT
133	0.731	Thiosulfate sulfurtransferase	THTR_RAT
184, 192	0.731	Carbonic anhydrase 5B, mitochondrial	CAH5B_RAT
308	0.759	Thioredoxin-dependent peroxide reductase,	PRDX3_RAT
278, 279	0.780	Galectin-3	LEG3_RAT
266, 267, 269, 270, 272, 275, 282, 284, 287-289, 295, 307	0.797	Fatty acid-binding protein, adipocyte	FABP4_RAT

(Continúa en la página siguiente)

Secretoma de TAVo (4 de 4)

Número de mancha	SecretomeP 2.0	Nombre de la proteína	Código Uniprot
163	0.808	Coatomer subunit epsilon	COPE_MOUSE
273	0.833	Transgelin-2	TAGL2_RAT
316, 317	0.848	Protein S100-A11	S10AB_RAT
277	0.851	Single-stranded DNA-binding protein, mitochondrial	SSBP_RAT
233	0.859	60S ribosomal protein L12	RL12_RAT
185, 207	0.888	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial	ECHM_RAT
163, 137	SignalP	Complement C3 ^[28]	CO3_RAT
132	SignalP	Alpha-1-inhibitor 3	A1I3_RAT
166	SignalP	Nidogen-2 ^[28]	NID2_MOUSE
77, 91	SignalP	Gelsolin ^[25, 28]	GELS_RAT
14, 25, 26, 29, 333, 334	SignalP	Serotransferrin ^[28]	TRFE_RAT
17-19, 88, 161, 180	SignalP	78 kDa glucose-regulated protein ^[28]	GRP78_RAT
28, 29, 33-36	SignalP	Serum albumin ^[28]	ALBU_RAT
54, 119	SignalP	Protein disulfide-isomerase	PDIA1_RAT
259	SignalP	Protein disulfide-isomerase A3	PDIA3_RAT
123	SignalP	Fibrinogen beta chain	FIBB_RAT
52	SignalP	Succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase 1	SCOT1_RAT
81	SignalP	Guanine deaminase	GUAD_RAT
16, 21-23	SignalP	Hemopexin ^[25]	HEMO_RAT
41, 42, 53, 66	SignalP	Calreticulin ^[28]	CALR_RAT
154, 164, 136, 137	SignalP	Protein disulfide-isomerase A6	PDIA6_RAT
42	SignalP	Serine protease inhibitor A3K	SPA3K_RAT
98	SignalP	Aspartate aminotransferase, mitochondrial	AATM_RAT
55, 67	SignalP	Alpha-1-antiproteinase	A1AT_RAT
67	SignalP	Serine protease inhibitor A3N	SPA3N_RAT
28	SignalP	Serine protease inhibitor A3L	SPA3L_RAT
104	SignalP	Cathepsin D ^[28]	CATD_RAT
110, 120	SignalP	Haptoglobin ^[25]	HPT_RAT
43	SignalP	Alpha-2-HS-glycoprotein	FETUA_RAT
212	SignalP	Glutathione S-transferase Mu 2	GSTM2_RAT
212	SignalP	Glutathione S-transferase Yb-3	GSTM4_RAT
138	SignalP	Adiponectin ^{27, 30}	ADIPO_MOUSE
181	SignalP	Serum amyloid P-component	SAMP_RAT
228	SignalP	Retinol-binding protein 4 ^[25, 28]	RET4_RAT
246	SignalP	7,8-dihydro-8-oxoguanine triphosphatase	8ODP_RAT
263	SignalP	Peroxiredoxin-5, mitochondrial	PRDX5_RAT
121, 260, 270	SignalP	Transthyretin	TTHY_RAT
87	SignalP	Osteocrin	OSTN_MOUSE

Tabla suplementaria 1: Secretoma de TAVo. Proteínas totales identificadas ordenadas según el índice otorgado por el software *SecretomeP* (Los números de mancha corresponden a la figura 52). SignalP: la proteína contiene péptido señal.

Secretoma de TAS (1 de 2)

Número de mancha	SecretomeP2.0	Nombre de la proteína	Código Uniprot
150	0.081	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	ROA2_MOUSE
67	0.101	Keratin, type II cytoskeletal 75	K2C75_RAT
82, 84	0.156	Proteasome subunit alpha type-4	PSA4_RAT
3	0.161	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	TERA_RAT
44-48	0.161	Creatine kinase M-type	KCRM_RAT
4	0.215	Vinculin	VINC_RAT
92	0.236	Proteasome subunit alpha type-7	PSA7_MOUSE
1	0.243	Spectrin alpha chain, brain	SPTA2_RAT
77	0.246	Proteasome subunit alpha type-3	PSA3_RAT
34, 38, 39, 40, 41	0.285	Beta-enolase	ENOB_RAT
76	0.290	14-3-3 protein gamma	1433G_RAT
113, 146, 147, 152	0.306	Nucleoside diphosphate kinase B	NDKB_RAT
114	0.324	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	PPIA_RAT
98	0.331	Proteasome subunit alpha type-2	PSA2_RAT
43	0.340	Aminoacylase-1A	ACY1A_RAT
113, 146, 147, 152	0.343	Nucleoside diphosphate kinase A	NDKA_RAT
144	0.348	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1A	FKB1A_RAT
78, 89, 90	0.353	Carbonic anhydrase 3	CAH3_RAT
56	0.357	Fructose-bisphosphate aldolase A	ALDOA_RAT
70	0.369	Filamin-B	FLNB_MOUSE
30	0.378	Cytosol aminopeptidase	AMPL_RAT
64	0.400	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	MDHC_RAT
97	0.401	Proteasome subunit beta type-3	PSB3_RAT
61	0.404	Transaldolase	TALDO_RAT
81, 87	0.408	Phosphoglycerate mutase 1	PGAM1_RAT
99	0.411	Proteasome subunit beta type-1	PSB1_RAT
43	0.416	Aminoacylase-1B	ACY1B_RAT
93, 94	0.416	Triosephosphate isomerase	TPIS_RAT
50, 63, 71	0.417	Fatty acid synthase	FAS_RAT
73	0.425	Proteasome subunit alpha type-1	PSA1_RAT
23, 55	0.427	Transketolase	TKT_RAT
105	0.427	Proteasome subunit beta type-2	PSB2_RAT
86	0.429	Proteasome subunit alpha type-6	PSA6_RAT
120	0.444	Fatty acid-binding protein, epidermal	FABP5_RAT
53	0.447	Aldose 1-epimerase	GALM_RAT
31	0.451	Plastin-3	PLST_RAT
140	0.456	D-dopachrome decarboxylase	DOPD_RAT
69	0.456	Malate dehydrogenase, mitochondrial	MDHM_RAT
79	0.465	Proteasome subunit alpha type-5	PSA5_RAT
95	0.505	Actin, cytoplasmic 2	ACTG_RAT
31	0.510	Plastin-2	PLSL_MOUSE
33	0.514	Glutathione reductase (Fragment)	GSHR_RAT
78, 82, 83, 88	0.518	Carbonic anhydrase 2	CAH2_RAT
109	0.528	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	PEBP1_RAT
30	0.532	Mitogen-activated protein kinase 3	MK03_RAT
34, 39, 40, 41	0.533	Alpha-enolase	ENOA_RAT
67	0.543	Ester hydrolase C11orf54 homolog	CK054_RAT
80	0.555	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	HPRT_RAT
107	0.555	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	SODM_RAT
139	0.562	Peroxisome oxidin-2	PRDX2_RAT

(Continúa en la página siguiente)

Secretoma de TAS (2 de 2)

Número de mancha	SecretomeP2.0	Nombre de la proteína	Código Uniprot
117, 119	0.566	Fatty acid-binding protein, heart	FABPH_RAT
96	0.568	Proteasome subunit beta type-4	PSB4_RAT
69	0.575	L-lactate dehydrogenase A chain	LDHA_RAT
100	0.579	Proteasome subunit beta type-6	PSB6_RAT
34, 38, 39, 40, 41	0.598	Gamma-enolase	ENOG_RAT
141, 150, 151, 153	0.598	Peroxiredoxin-1	PRDX1_RAT
66	0.612	Pyridoxal kinase	PDXK_RAT
110	0.623	Ferritin heavy chain	FRIH_RAT
26	0.653	Sulfite oxidase, mitochondrial	SUOX_RAT
102, 104	0.657	Abhydrolase domain-containing protein 14B	ABHEB_RAT
116	0.682	Cellular retinoic acid-binding protein 1	RABP1_RAT
159	0.693	Ubiquitin	UBIQ_CRIGR
115, 126	0.694	Cellular retinoic acid-binding protein 2	RABP2_RAT
127	0.698	Thioredoxin ^[25]	THIO_RAT
149	0.706	Macrophage migration inhibitory factor ^[25]	MIF_RAT
111, 112, 124	0.728	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	SODC_RAT
35	0.735	Dipeptidyl-peptidase 1	CATC_RAT
118, 128	0.737	Coactosin-like protein	COTL1_MOUSE
152	0.758	SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein 3	SH3L3_MOUSE
118, 121	0.797	Fatty acid-binding protein, adipocyte	FABP4_RAT
130	0.863	Galectin-7	LEG7_RAT
84	SignalP	Collagen alpha-1(IV) chain ^[28]	CO4A1_MOUSE
2	SignalP	Epithelial cadherin	CADH1_RAT
5-9, 16-20	SignalP	Serotransferrin ^[28]	TRFE_RAT
10	SignalP	78 kDa glucose-regulated protein ^[28]	GRP78_RAT
11, 12, 14, 15	SignalP	Serum albumin ^[28]	ALBU_RAT
27, 28, 29	SignalP	Carboxylesterase 3	CES3_RAT
25, 51	SignalP	Protein disulfide-isomerase	PDIA1_RAT
32	SignalP	Succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase 1, mitochondrial	SCOT1_RAT
36, 37	SignalP	Guanine deaminase	GUAD_RAT
21, 24	SignalP	Calreticulin	CALR_RAT
49	SignalP	Cathepsin D ^[28]	CATD_RAT
150	SignalP	Peroxiredoxin-4	PRDX4_MOUSE
125	SignalP	15.5 kDa fatty acid-binding protein	15.5 kDa FABP
129	SignalP	Transthyretin	TTHY_RAT

Tabla suplementaria 2: Secretoma de TAS. Proteínas totales identificadas ordenadas según el índice otorgado por el software *SecretomeP* (Los números de mancha corresponden a la figura 53). SignalP: la proteína contiene péptido señal.

Secretoma de TAVg (1 de 2)

Número de mancha	SecretomeP2.0	Nombre de la proteína	Código Uniprot
5	0.161	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	TERA_RAT
16	0.229	Heat shock cognate 71 kDa protein	HSP7C_RAT
3	0.243	Spectrin alpha chain, brain	SPTA2_RAT
99	0.244	14-3-3 protein zeta/delta	1433Z_RAT
100	0.246	Proteasome subunit alpha type-3	PSA3_RAT
15, 16	0.250	Heat shock-related 70 kDa protein 2	HSP72_RAT
98, 99	0.256	14-3-3 protein theta	1433T_RAT
16	0.259	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B	HSP71_RAT
43, 44	0.285	Beta-enolase	ENOB_RAT
98, 99	0.290	14-3-3 protein gamma	1433G_RAT
16	0.294	Heat shock 70 kDa protein 1L	HS71L_RAT
104	0.309	Glutathione S-transferase alpha-3	GSTA3_RAT
31	0.320	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	CH60_RAT
98, 99	0.330	14-3-3 protein epsilon	1433E_RAT
68	0.340	Aminoacylase-1A	ACY1A_RAT
98, 99	0.349	14-3-3 protein eta	1433F_RAT
98, 99	0.352	14-3-3 protein beta/alpha	1433B_RAT
37, 64, 97, 104	0.353	Carbonic anhydrase 3	CAH3_RAT
70, 72	0.357	Fructose-bisphosphate aldolase A	ALDOA_RAT
65	0.362	Adenosine deaminase	ADA_RAT
90	0.369	Tropomyosin alpha-3 chain	TPM3_RAT
25, 26	0.370	Catalase	CATA_RAT
33	0.378	Cytosol aminopeptidase	AMPL_RAT
63	0.380	Glutamine synthetase	GLNA_RAT
101	0.380	Isoamyl acetate-hydrolyzing esterase 1 homolog	IAH1_RAT
62, 63	0.392	Acyl-coenzyme A thioesterase 2, mitochondrial	ACOT2_RAT
74, 79	0.405	Aldose reductase	ALDR_RAT
103	0.408	Phosphoglycerate mutase 1	PGAM1_RAT
8, 23, 24, 25	0.416	NADP-dependent malic enzyme	MAOX_RAT
68	0.416	Aminoacylase-1B	ACY1B_RAT
95	0.425	Proteasome subunit alpha type-1	PSA1_RAT
12	0.427	Transketolase	TKT_RAT
89	0.432	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase,	HCDH_RAT
111	0.436	Hemoglobin subunit beta-2	HBB2_RAT
102	0.446	Ferritin light chain 1	FRIL1_RAT
71	0.447	Aldose 1-epimerase	GALM_RAT
43	0.451	Alanine aminotransferase 1	ALAT1_RAT
45, 81, 85, 86	0.456	Malate dehydrogenase, mitochondrial	MDHM_RAT
106, 111	0.462	Hemoglobin subunit beta-1	HBB1_RAT
90	0.488	Tropomyosin alpha-4 chain	TPM4_RAT
94	0.489	Proteasome subunit beta type-7	PSB7_RAT
55, 56	0.501	Fumarate hydratase, mitochondrial	FUMH_RAT
58, 59	0.504	Actin, alpha cardiac muscle 1	ACTC_RAT
58, 59	0.505	Actin, cytoplasmic 2	ACTG_RAT
58, 59	0.505	Actin, aortic smooth muscle	ACTA_RAT
63	0.508	3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial	THIM_RAT
57, 59	0.512	Actin, gamma-enteric smooth muscle	ACTH_RAT
61, 96	0.514	Purine nucleoside phosphorylase	PNPH_RAT
90	0.518	Tropomyosin beta chain	TPM2_RAT
43, 44	0.533	Alpha-enolase	ENOA_RAT
39	0.540	Selenium-binding protein 1	SBP1_RAT
80	0.543	Ester hydrolase C11orf54 homolog	CK054_RAT

(Continúa en la página siguiente)

Secretoma de TAVg (2 de 2)

Número de mancha	SecretomeP 2.0	Nombre de la proteína	Código Uniprot
87, 88	0.546	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD+]	GPDA_RAT
97	0.549	Nitrilase homolog 2	NIT2_RAT
77, 78	0.568	L-lactate dehydrogenase B chain	LDHB_RAT
45	0.575	L-lactate dehydrogenase A chain	LDHA_RAT
61	0.576	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	IDHC_MOUSE
100	0.583	F-actin-capping protein subunit beta	CAPZB_RAT
9	0.589	Keratin, type I cytoskeletal 10	K1C10_RAT
43, 44	0.598	Gamma-enolase	ENOG_RAT
78, 111	0.612	Hemoglobin subunit alpha-1/2	HBA_RAT
69	0.616	Fumarylacetoacetase	FAAA_RAT
90	0.624	Tropomyosin alpha-1 chain	TPM1_RAT
67	0.634	Isovaleryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	IVD_RAT
32	0.653	Sulfite oxidase, mitochondrial	SUOX_RAT
113	0.693	Ubiquitin	UBIQ_CRIGR
105	0.698	Thioredoxin [25]	THIO_RAT
93, 94, 101	0.731	Carbonic anhydrase 5B, mitochondrial	CAH5B_RAT
102	0.759	Thioredoxin-dependent peroxide reductase,	PRDX3_RAT
106, 108	0.797	Fatty acid-binding protein, adipocyte	FABP4_RAT
92	SignalP	Nidogen-2 [28]	NID2_MOUSE
55, 57, 58, 62	SignalP	Gelsolin [25, 28]	GELS_RAT
2, 10, 11, 13, 14	SignalP	Serotransferrin [28]	TRFE_RAT
15, 90	SignalP	78 kDa glucose-regulated protein [28]	GRP78_RAT
1	SignalP	Cell surface glycoprotein MUC18 [28]	MUC18_RAT
6, 7, 17-22	SignalP	Serum albumin [28]	ALBU_RAT
38	SignalP	Protein disulfide-isomerase	PDIA1_RAT
52, 53	SignalP	Guanine deaminase	GUAD_RAT
50	SignalP	Tissue alpha-L-fucosidase	FUCO_RAT
35	SignalP	Angiotensinogen	ANGT_RAT
27, 34	SignalP	Calreticulin [28]	CALR_RAT
46, 75, 82	SignalP	Protein disulfide-isomerase A6	PDIA6_RAT
40, 41, 42	SignalP	Alpha-1-antitrypsin	A1AT_RAT
40, 41, 48, 49, 51	SignalP	Serine protease inhibitor A3N	SPA3N_RAT
104	SignalP	Plasminogen activator inhibitor 1	PAI1_RAT
66	SignalP	Cathepsin D [28]	CATD_RAT
28-30	SignalP	Alpha-2-HS-glycoprotein	FETUA_RAT
102	SignalP	Endoplasmic reticulum protein ERp29	ERP29_RAT
83, 84	SignalP	Adiponectin [25, 28]	ADIPO_MOUSE
60	SignalP	Transthyretin	TTHY_RAT
110	SignalP	Beta-2-microglobulin	B2MG_RAT

Tabla suplementaria 3: Secretoma de TAVg. Proteínas totales identificadas ordenadas según el índice otorgado por el software *SecretomeP* (Los números de mancha corresponden a la figura 54). SignalP: la proteína contiene péptido señal.

Análisis diferencial TAVo vs. TAS vs. TAVg

Número de mancha	SecretomeP 2.0	Nombre de la proteína	Código Uniprot	Presencia
1	0.320	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	CH60_RAT	G>V>S
36	0.324	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	PPIA_RAT	S>V>G
2	0.370	Catalase	CATA_RAT	V>G
26	0.385	AP-1 complex subunit beta-1	AP1B1_RAT	S>V>G
42	0.407 (secreted in Uniprot)	Galectin-1	LEG1_RAT	G>V>S
20	0.429	Proteasome subunit alpha type-6	PSA6_RAT	S>V>G
30	0.437	Thyroid hormone-inducible hepatic protein	THRSP_RAT	G>V>S
10	0.451	Alanine aminotransferase 1	ALAT1_RAT	G>V>S
7	0.477	Adenosine kinase	ADK_RAT	G>V
8	0.501	Fumarate hydratase, mitochondrial	FUMH_RAT	G>V>S
23	0.505	Actin, cytoplasmic 2	ACTG_RAT	V>G>S
9	0.505	Actin, cytoplasmic 2	ACTG_RAT	G>V>S
12	0.509	Aspartate aminotransferase, mitochondrial	AATM_RAT	G>V>S
22	0.527	Translationally-controlled tumor protein	TCTP_RAT	G>V>S
16	0.549	Omega-amidase NIT2	NIT2_RAT	V>G
27	0.562	Peroxiredoxin-2	PRDX2_RAT	G>V>S
35	0.582	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 L3	UB2L3_MOUSE	G>V>S
45	0.598	Peroxiredoxin-1	PRDX1_RAT	S>V>G
29	0.598	Peroxiredoxin-1	PRDX1_RAT	G>V>S
11	0.623	3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase, mitochondrial	HIBCH_RAT	V>G>S
38	0.628	Transgelin	TAGL_RAT	G>V
41	0.628	Transgelin	TAGL_RAT	V>G>S
32	0.628	Transgelin	TAGL_RAT	S>V>G
15	0.731	Carbonic anhydrase 5B, mitochondrial	CAH5B_RAT	V>S>G
25	0.759	Thioredoxin-dependent peroxide reductase	PRDX3_RAT	V>G>S
43	0.797	Fatty acid-binding protein	FABP4_RAT	S>G>V
17	0.888	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial	ECHM_RAT	V>G>S
21	0.888	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial	ECHM_RAT	G>V>S
18	SignalP	Adiponectin	ADIPO_MOUSE	S>V>G
37	SignalP	Protein disulfide-isomerase A6	PDIA6_RAT	V>G>S
4	SignalP	Angiotensinogen	ANGT_RAT	G>V>S
3	SignalP	Vitamin D-binding protein	VTDB_RAT	S>V>G
6	SignalP	Gelsolin	GELS_RAT	V
40	SignalP	Gelsolin	GELS_RAT	V>G>S
14	SignalP	Thrombospondin-1	TSP1_MOUSE	V>G
24	SignalP	Thrombospondin-1	TSP1_MOUSE	G>V>S
13	SignalP	Murineoglobulin-1	MUG1_RAT	S>V>G

Tabla suplementaria 4: Análisis diferencial TAVo vs. TAS vs. TAVg. Proteínas totales identificadas ordenadas según el índice otorgado por el software *SecretomeP* (Los números de mancha corresponden a la figura 61). SignalP: la proteína contiene péptido señal.

Secretoma gastrocnemio (1 de 2)

Número de mancha	SecretomeP2.0	Nombre de la proteína	Código Uniprot
106, 112, 134	No secretada	Titin	TITIN_MOUSE
24	0.128	Myosin-1	MYH1_MOUSE
49	0.141	Myosin-8	MYH8_MOUSE
124	0.147	Myosin-6	MYH6_RAT
1, 5, 6, 9, 19, 31, 32, 45, 110, 124, 126, 128, 130, 142, 144, 148	0.148	Myosin-4	MYH4_RAT
143, 150, 151, 154	0.154	Myosin-3 OS=Rattus norvegicus GN=Myh4 PE=2 SV=1	MYH3_RAT
22, 29, 39, 40, 41, 42, 43, 47, 88, 89, 101, 108, 114, 125, 127, 129, 133, 139, 145	0.161	Creatine kinase M-type	KCRM_RAT
14	0.161	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	TERA_RAT
124, 130	0.165	Myosin-7	MYH7_RAT
20	0.229	Heat shock cognate 71 kDa protein	HSP7C_MOUSE
109, 124	0.259	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B	HSP71_RAT
75, 82, 85, 86, 132, 141, 157	0.263	Parvalbumin alpha	PRVA_RAT
46, 48, 59, 61, 74	0.282	Beta-enolase	ENOB_MOUSE
115	0.306	Nucleoside diphosphate kinase B	NDKB_RAT
23	0.320	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	CH60_RAT
90, 91, 95, 134, 135, 136	0.323	Myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform	MLRS_RAT
7, 8, 13, 30, 65, 69	0.353	Carbonic anhydrase 3	CAH3_RAT
48, 52, 65, 79, 80, 138	0.357	Fructose-bisphosphate aldolase A	ALDOA_RAT
56	0.400	Malate dehydrogenase	MDHC_RAT
47	0.400	Phosphoglycerate kinase 1	PGK1_RAT
57, 100	0.405	Aldose reductase	ALDR_RAT
15, 16, 17	0.406	Glycogen phosphorylase	PYGM_RAT
123, 129, 131, 133	0.408	Histone H4	H4_RAT
70	0.410	Lactoylglutathione lyase	LGUL_RAT
58, 59, 60, 62, 63, 64, 77	0.416	Triosephosphate isomerase	TPIS_RAT
107	0.436	Hemoglobin subunit beta-2	HBB2_RAT
25, 26, 28	0.440	Phosphoglucomutase-1	PGM1_RAT
104	0.444	Fatty acid-binding protein, adipocyte	FABP4_RAT
2, 3, 4, 7, 8, 10, 11, 12, 27, 28, 29, 137	0.447	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	KPYM_RAT
111	0.456	D-dopachrome decarboxylase	DOPD_RAT
50, 51	0.461	Filamin-C	FLNC_MOUSE
96, 97, 98	0.462	Hemoglobin subunit beta-1	HBB1_RAT
155, 156	0.466	Polyubiquitin-B	UBB_RAT
44	0.518	Tropomyosin beta chain	TPM2_RAT
71, 72	0.528	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	PEBP1_RAT
34, 35, 36, 38	0.533	Alpha-enolase	ENOA_RAT
77, 78	0.537	Protein DJ-1	PARK7_RAT
103	0.554	Profilin-2	PROF2_RAT
81	0.555	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	SODM_RAT
116	0.562	Peroxiredoxin-2	PRDX2_RAT
87, 102, 105, 107	0.566	Fatty acid-binding protein, heart	FABPH_RAT
54	0.568	L-lactate dehydrogenase B chain	LDHB_RAT
55	0.570	Nitrilase homolog 1	NIT1_RAT
68	0.575	L-lactate dehydrogenase A chain	LDHA_RAT
149	0.580	Barrier-to-autointegration factor	BAF_RAT
28	0.591	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial	DLDH_RAT
140	0.598	Peroxiredoxin-1	PRDX1_RAT
122	0.602	Myotilin OS=Mus musculus GN=Myot PE=2 SV=1	MYOTI_MOUSE
113	0.609	Troponin I, fast skeletal muscle	TNNI2_RAT
98, 107	0.612	Hemoglobin subunit alpha-1/2	HBA_RAT

(Continúa en la página siguiente)

Secretoma gastrocnemio (2 de 2)

Número de mancha	SecretomeP 2.0	Nombre de la proteína	Código Uniprot
76, 91, 158	0.619	Myosin light chain 1/3, skeletal muscle isoform	MYL1_RAT
119, 120	0.619	Myosin light chain 3, skeletal muscle isoform	MLE3_RAT
65, 66, 67, 69	0.619	Phosphoglycerate mutase 2	PGAM2_RAT
44	0.624	Tropomyosin alpha-1 chain	TPM1_RAT
118	0.625	Nuclear transport factor 2	NTF2_RAT
92, 93, 94	0.645	Myoglobin	MYG_RAT
83	0.669	Troponin C, skeletal muscle	TNNC2_MOUSE
84	0.676	Calmodulin	CALM_RAT
32, 146	0.684	Desmin	DESM_RAT
147, 152, 153	0.687	PDZ and LIM domain protein 3	PDLI3_RAT
131	0.707	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2	NDUV2_RAT
73, 99	0.728	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	SODC_RAT
109	0.829	Telethonin	TELT_MOUSE
17, 18, 21, 33, 107, 121	SignalP	Serotransferrin	TRFE_RAT
21, 33, 107, 121	SignalP	Serum albumin	ALBU_RAT
117	SignalP	Thioredoxin, mitochondrial	THIOM_RAT
37	SignalP	Transthyretin	TTHY_RAT

Tabla suplementaria 5: Secretoma de gastrocnemio. Proteínas totales identificadas ordenadas según el índice otorgado por el software *SecretomeP* (Los números de mancha corresponden a la figura 71). SignalP: la proteína contiene péptido señal.

Secretoma sólo (1 de 2)

Número de mancha	SecretomeP2.0	Nombre de la proteína	Código Uniprot
86	No secretada	Plectin-1	PLEC1_RAT
1, 3, 4, 5, 8, 9, 14, 16, 17, 19, 37, 47, 62, 64, 65, 66, 72, 73, 91, 92, 93, 94, 95, 113, 118, 127, 129, 130, 134, 138, 142, 144, 147, 153, 154, 155, 159	No secretada	Titin	TITIN_MOUSE
73, 81, 82	0.147	Myosin-6	MYH6_RAT
40, 41, 42, 43, 53, 67, 98, 115, 141	0.161	Creatine kinase M-type	KCRM_RAT
21, 15, 73, 81, 82, 122	0.163	Myosin-7	MYH7_MOUSE
71	0.246	Proteasome subunit alpha type-3	PSA3_RAT
76	0.249	Myomesin-1	MYOM1_MOUSE
7, 127	0.250	Heat shock cognate 71 kDa protein	HSP7C_RAT
101	0.259	Myomesin-3	MYOM3_MOUSE
25, 26, 27, 28, 29	0.285	Beta-enolase	ENOB_RAT
117	0.306	Nucleoside diphosphate kinase B	NDKB_RAT
85	0.309	Glutathione S-transferase alpha-3	GSTA3_RAT
161	0.312	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40	RL40_RAT
160	0.312	Polyubiquitin-B	UBB_RAT
107	0.318	Troponin C, slow skeletal and cardiac muscles	TNNC1_MOUSE
157	0.318	Four and a half LIM domains protein 1	FHL1_RAT
22	0.320	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	CH60_RAT
117, 158	0.343	Nucleoside diphosphate kinase A	NDKA_RAT
140	0.348	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1A	FKB1A_RAT
24	0.351	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	UGPA_MOUSE
66, 80, 83, 84, 103	0.353	Carbonic anhydrase 3	CAH3_RAT
48, 97	0.357	Fructose-bisphosphate aldolase A	ALDOA_RAT
36	0.392	Acyl-coenzyme A thioesterase 2, mitochondrial	ACOT2_RAT
51, 58	0.400	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	MDHC_RAT
44, 46, 78, 84	0.400	Phosphoglycerate kinase 1	PGK1_RAT
52, 136	0.405	Aldose reductase	ALDR_RAT
36	0.406	Acyl-coenzyme A thioesterase 1	ACOT1_RAT
11, 39, 56, 60, 108, 123	0.408	Myosin-binding protein C, slow-type (Fragment)	MYPC1_RAT
87, 88, 89, 90	0.416	Triosephosphate isomerase	TPIS_RAT
119	0.421	Elongation factor 1-gamma	EF1G_RAT
70	0.425	Proteasome subunit alpha type-1	PSA1_RAT
100	0.427	Proteasome subunit beta type-2	PSB2_RAT
83	0.429	Proteasome subunit alpha type-6	PSA6_RAT
68, 69	0.432	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial	HCDH_RAT
85, 115, 131	0.436	Hemoglobin subunit beta-2	HBB2_RAT
12, 13	0.440	Phosphoglucomutase-1	PGM1_RAT
135	0.444	Fatty acid-binding protein, epidermal	FABP5_RAT
143	0.456	D-dopachrome decarboxylase	DOPD_RAT
59	0.456	Malate dehydrogenase, mitochondrial	MDHM_RAT
34, 35	0.460	Tripartite motif-containing protein 72	TRI72_RAT
2, 61, 63, 151	0.461	Filamin-C	FLNC_MOUSE
132, 133, 85	0.463	Hemoglobin subunit beta-1	HBB1_RAT
74, 77	0.489	Proteasome subunit beta type-7	PSB7_RAT
130	0.490	Cytochrome c, somatic	CYC_RAT
138	0.490	Cytochrome c, somatic	CYC_RAT
30, 31, 32	0.501	Fumarate hydratase, mitochondrial	FUMH_RAT
33, 38, 57	0.504	Actin, alpha cardiac muscle 1	ACTC_RAT
33, 38, 57, 72	0.504	Actin, alpha skeletal muscle	ACTS_RAT
33, 38, 57, 72	0.505	Actin, aortic smooth muscle	ACTA_RAT
70	0.507	Glutathione transferase omega-1	GSTO1_RAT

(Continúa en la página siguiente)

Secretoma sólo (2 de 2)

Número de mancha	SecretomeP2.0	Nombre de la proteína	Código Uniprot
33, 57, 72	0.512	Actin, gamma-enteric smooth muscle	ACTH_RAT
105	0.528	Phosphatidylethanolamine-binding protein	PEBP1_RAT
25, 27, 28, 77	0.533	Alpha-enolase	ENOA_RAT
54, 55, 141	0.535	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	G3P_RAT
23	0.540	Selenium-binding protein 1	SBP1_RAT
75	0.549	Omega-amidase NIT2	NIT2_RAT
152	0.555	10 kDa heat shock protein, mitochondrial	CH10_RAT
101, 102	0.555	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	SODM_RAT
79	0.555	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	HPRT_RAT
104	0.562	Peroxiredoxin-2	PRDX2_RAT
125, 128, 137, 145	0.566	Fatty acid-binding protein, heart	FABPH_RAT
50, 51	0.568	L-lactate dehydrogenase B chain	LDHB_RAT
110	0.581	Heat shock protein beta-6	HSPB6_RAT
20	0.591	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial	DLDH_RAT
99, 146	0.598	Peroxiredoxin-1	PRDX1_RAT
25, 27, 28, 29	0.598	Gamma-enolase	ENOG_RAT
109	0.601	Vimentin	VIME_RAT
148, 149	0.602	Myotilin	MYOTI_MOUSE
85, 139, 140	0.612	Hemoglobin subunit alpha-1/2	HBA_RAT
123	0.619	Myosin light chain 3, skeletal muscle isoform	MLE3_RAT
123	0.619	Myosin light chain 1, skeletal muscle isoform	MLE1_RAT
84	0.619	Phosphoglycerate mutase 2	PGAM2_RAT
106	0.623	Ferritin heavy chain	FRIH_RAT
116	0.628	Cofilin-1	COF1_RAT
124	0.645	Myoglobin	MYG_RAT
108, 109, 159	0.665	Desmin	DESM_RAT
116	0.683	Cofilin-2	COF2_MOUSE
156	0.700	Histone H3.3	H33_RAT
151	0.710	Acylphosphatase-2	ACYP2_RAT
120	0.728	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	SODC_RAT
96	0.759	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial	PRDX3_RAT
114	0.833	Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial	UCRI_RAT
111, 112	0.886	Alpha-crystallin B chain	CRYAB_RAT
126	0.921	Heat shock protein beta-7 (Fragment)	HSPB7_RAT
150	SignalP	Thioredoxin, mitochondrial	THIOM_RAT
121	SignalP	Peroxiredoxin-5, mitochondrial	PRDX5_RAT
91	SignalP	ES1 protein homolog, mitochondrial	ES1_RAT
44, 45	SignalP	Creatine kinase, ubiquitous mitochondrial	KCRU_RAT
44, 45, 46	SignalP	Creatine kinase, sarcomeric mitochondrial	KCRS_RAT
49	SignalP	Aspartate aminotransferase, mitochondrial	AATM_RAT
10	SignalP	Calreticulin	CALR_RAT
18	SignalP	Protein disulfide-isomerase	PDIA1_RAT
6	SignalP	Serotransferrin	TRFE_RAT

Tabla suplementaria 6: Secretoma de sólo. Proteínas totales identificadas ordenadas según el índice otorgado por el software *SecretomeP* (Los números de mancha corresponden a la figura 72). SignalP: la proteína contiene péptido señal.

Análisis diferencial gastrocnemio vs. sóleo

Número de mancha	SecretomeP2.0	Nombre de la proteína	Código Uniprot
32	No secretada	Plectin	PLEC_RAT
5, 22, 34, 41	No secretada	Titin	TITIN_MOUSE
43	0.148	Myosin-4	MYH4_RAT
31, 37	0.153	Heat shock protein beta-2	HSPB2_RAT
38	0.249	Myomesin-1	MYOM1_MOUSE
44	0.263	Parvalbumin alpha	PRVA_RAT
4, 12, 35	0.285	Beta-enolase	ENOB_RAT
23	0.366	Calcineurin-like phosphoesterase domain-containing	CPPED_RAT
45	0.384	Keratin, type I cytoskeletal 14	K1C14_RAT
6	0.388	Lactoylglutathione lyase	LGUL_RAT
18	0.405	Aldose reductase	ALDR_RAT
21	0.408	Myosin-binding protein C, slow-type (Fragment)	MYPC1_RAT
33	0.413	Beta-centractin	ACTY_MOUSE
3, 10	0.416	Triosephosphate isomerase	TPIS_RAT
29	0.421	Elongation factor 1-gamma	EF1G_RAT
16	0.425	Proteasome subunit alpha type-1	PSA1_RAT
30	0.446	Ferritin light chain 1	FRIL1_RAT
11, 20	0.447	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	KPYM_RAT
15	0.451	Alanine aminotransferase 1	ALAT1_RAT
15, 17	0.460	Tripartite motif-containing protein 72	TRI72_RAT
9	0.496	Phosphoglycolate phosphatase	PGP_MOUSE
23	0.504	Actin, alpha skeletal muscle	ACTS_RAT
28	0.528	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	PEBP1_RAT
35, 36	0.533	Alpha-enolase	ENOA_RAT
2	0.537	Protein DJ-1	PARK7_RAT
13	0.554	Profilin-2	PROF2_RAT
19	0.566	Fatty acid-binding protein, heart	FABPH_RAT
46	0.583	Keratin, type I cytoskeletal 42	K1C42_RAT
4, 12, 35, 36	0.598	Gamma-enolase	ENOG_RAT
8	0.619	Myosin light chain 1/3, skeletal muscle isoform	MYL1_RAT
14	0.625	Nuclear transport factor 2	NTF2_RAT
26	0.645	Myoglobin	MYG_RAT
40	0.665	Desmin	DESM_RAT
1	0.669	Troponin C, skeletal muscle	TNNC2_MOUSE
27, 46, 47	0.886	Alpha-crystallin B chain	CRYAB_RAT
24	0.888	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial	ECHM_RAT
42	SignalP	Aspartate aminotransferase, mitochondrial	AATM_RAT
7, 35	SignalP	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD+], cytoplasmic	GPDA_RAT
25	SignalP	Lysozyme C-1	LYZ1_MOUSE
39	SignalP	Protein disulfide-isomerase	PDIA1_RAT

Tabla suplementaria 7: Análisis diferencial gastrocnemio vs. sóleo. Proteínas totales identificadas ordenadas según el índice otorgado por el software *SecretomeP* (Los números de mancha corresponden a la figura 74). SignalP: la proteína contiene péptido señal.

Análisis diferencial gastrocnemio control vs. ejercicio

Número de mancha	SecretomeP2.0	Nombre de la proteína	Código Uniprot
4	0.161	Creatine kinase M-type	KCRM_RAT
18	0.161	Creatine kinase M-type	KCRM_RAT
20	0.161	Creatine kinase M-type	KCRM_RAT
12	0.282	Beta-enolase	ENOB_MOUSE
21	0.282	Beta-enolase	ENOB_MOUSE
2	0.285	Beta-enolase	ENOB_RAT
3	0.330	14-3-3 protein epsilon	1433E_RAT
11	0.357	Fructose-bisphosphate aldolase A	ALDOA_RAT
21	0.405	Aldose reductase	ALDR_RAT
1	0.416	Triosephosphate isomerase	TPIS_RAT
8	0.416	Triosephosphate isomerase	TPIS_RAT
9	0.440	Phosphoglucomutase-1	PGM1_RAT
10	0.504	Actin, alpha cardiac muscle 1	ACTC_RAT
12	0.533	Alpha-enolase	ENOA_RAT
21	0.533	Alpha-enolase	ENOA_RAT
27	0.551	N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1	DDAH1_RAT
28	0.560	Keratin, type I cuticular Ha5	KRT35_MOUSE
6	0.566	Fatty acid-binding protein, heart	FABPH_RAT
12	0.598	Gamma-enolase	ENOG_RAT
17	0.620	Enolase-phosphatase E1	ENOPH_RAT
7	0.624	Tropomyosin alpha-1 chain	TPM1_RAT
22	0.624	Tropomyosin alpha-1 chain	TPM1_RAT
25	0.624	Tropomyosin alpha-1 chain	TPM1_RAT
13	0.684	Desmin	DESM_MOUSE
14	0.684	Desmin	DESM_MOUSE
5	SignalP	Transthyretin	TTHY_RAT

Tabla suplementaria 8: Análisis diferencial gastrocnemio control vs. ejercicio. Proteínas totales identificadas ordenadas según el índice otorgado por el software *SecretomeP* (Los números de mancha corresponden a la figura 75C). SignalP: la proteína contiene péptido señal.

Análisis diferencial sóleo control vs. ejercicio

Número de mancha	SecretomeP2.0	Nombre de la proteína	Código Uniprot
9, 11	0.161	Creatine kinase M-type	KCRM_RAT
17	0.285	Beta-enolase	ENOB_RAT
3	0.290	14-3-3 protein gamma	1433G_RAT
1, 6	0.323	Myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform	MLRS_RAT
5	0.330	14-3-3 protein epsilon	1433E_RAT
23	0.378	Cytosol aminopeptidase	AMPL_RAT
2, 4	0.384	Tropomyosin alpha-3 chain	TPM3_RAT
4	0.400	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	MDHC_RAT
10	0.416	Dihydropyrimidinase-related protein 2	DPYL2_RAT
13	0.416	Triosephosphate isomerase	TPIS_RAT
27	0.440	Phosphoglucomutase-1	PGM1_RAT
12, 15	0.460	Tripartite motif-containing protein 72	TRI72_RAT
28	0.483	Inosine triphosphate pyrophosphatase	ITPA_MOUSE
16	0.484	Haloacid dehalogenase-like hydrolase	HDHD2_RAT
19	0.486	4-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase	AL9A1_RAT
4	0.488	Tropomyosin alpha-4 chain	TPM4_RAT
24	0.504	Actin, alpha cardiac muscle 1	ACTC_RAT
20	0.504	Actin, alpha skeletal muscle	ACTS_RAT
2, 4, 8	0.518	Tropomyosin beta chain	TPM2_RAT
24	0.528	Phosphatidylethanolamine-binding protein	PEBP1_RAT
17	0.533	Alpha-enolase	ENOA_RAT
18	0.540	Selenium-binding protein 1	SBP1_RAT
7	0.579	Proteasome subunit beta type-6	PSB6_RAT
22	0.580	V-type proton ATPase subunit B, brain isoform	VATB2_RAT
17	0.598	Gamma-enolase	ENOG_RAT
14	0.606	N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2	DDAH2_RAT
2, 8	0.624	Tropomyosin alpha-1 chain	TPM1_RAT
9	0.634	Isovaleryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	IVD_RAT
28	0.657	Abhydrolase domain-containing protein 14B	ABHEB_RAT
26	0.803	Nucleophosmin	NPM_RAT
21	0.858	Calpain small subunit 1	CPNS1_RAT
25	0.859	60S ribosomal protein L12	RL12_RAT
20	SignalP	Fibrinogen beta chain	FIBB_RAT

Tabla suplementaria 9: Análisis diferencial sóleo control vs. ejercicio. Proteínas totales identificadas ordenadas según el índice otorgado por el software *SecretomeP* (Los números de mancha corresponden a la figura 75D). SignalP: la proteína contiene péptido señal.

VIII. Bibliografía

1. Spiegelman, B.M. and J.S. Flier, *Obesity and the regulation of energy balance*. Cell, 2001. **104**(4): p. 531-43.
2. Wells, J.C., *The evolution of human adiposity and obesity: where did it all go wrong?* Dis Model Mech, 2012. **5**(5): p. 595-607.
3. Bellisari, A., *Evolutionary origins of obesity*. Obes Rev, 2008. **9**(2): p. 165-80.
4. Martins, C., M.D. Robertson, and L.M. Morgan, *Effects of exercise and restrained eating behaviour on appetite control*. Proc Nutr Soc, 2008. **67**(1): p. 28-41.
5. Kopelman, P.G., *Obesity as a medical problem*. Nature, 2000. **404**(6778): p. 635-43.
6. Hocking, S., et al., *Adiposity and Insulin Resistance in Humans: The Role of the Different Tissue and Cellular Lipid Depots*. Endocr Rev, 2013.
7. Rossner, S., *Obesity: the disease of the twenty-first century*. Int J Obes Relat Metab Disord, 2002. **26 Suppl 4**: p. S2-4.
8. WHO. *Obesity and overweight*. 2012; Available from: <http://www.who.int/topics/obesity/en/>.
9. Malik, V.S., W.C. Willett, and F.B. Hu, *Global obesity: trends, risk factors and policy implications*. Nat Rev Endocrinol, 2012. **9**(1): p. 13-27.
10. IDEFICS. *IDEFICS Study*. 2013; Available from: <http://www.ideficsstudy.eu/Idefics/home>.
11. Bessesen, D.H., *Update on obesity*. J Clin Endocrinol Metab, 2008. **93**(6): p. 2027-34.
12. Wadikar, D.D. and K.S. Premavalli, *Appetite control and obesity*. Crit Rev Food Sci Nutr, 2012. **52**(10): p. 949-56.
13. Sarwer, D.B., et al., *Behavior therapy for obesity: where are we now?* Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes, 2009. **16**(5): p. 347-52.
14. Church, T.S., et al., *Effects of different doses of physical activity on cardiorespiratory fitness among sedentary, overweight or obese postmenopausal women with elevated blood pressure: a randomized controlled trial*. JAMA, 2007. **297**(19): p. 2081-91.
15. Sui, X., et al., *Cardiorespiratory fitness and adiposity as mortality predictors in older adults*. JAMA, 2007. **298**(21): p. 2507-16.
16. Hainer, V., H. Toplak, and A. Mitrakou, *Treatment modalities of obesity: what fits whom?* Diabetes Care, 2008. **31 Suppl 2**: p. S269-77.
17. Bray, G.A. and L.A. Tartaglia, *Medicinal strategies in the treatment of obesity*. Nature, 2000. **404**(6778): p. 672-7.
18. Adams, T.D., et al., *Gastrointestinal surgery: cardiovascular risk reduction and improved long-term survival in patients with obesity and diabetes*. Curr Atheroscler Rep, 2012. **14**(6): p. 606-15.
19. Noria, S.F. and T. Grantcharov, *Biological effects of bariatric surgery on obesity-related comorbidities*. Can J Surg, 2013. **56**(1): p. 47-57.
20. Lagerros, Y.T. and S. Rossner, *Obesity management: what brings success?* Therap Adv Gastroenterol, 2013. **6**(1): p. 77-88.
21. Klein, S., *Outcome success in obesity*. Obes Res, 2001. **9 Suppl 4**: p. 354S-358S.
22. Moitra, J., et al., *Life without white fat: a transgenic mouse*. Genes Dev, 1998. **12**(20): p. 3168-81.
23. Seip, M. and O. Trygstad, *Generalized lipodystrophy, congenital and acquired (lipoatrophy)*. Acta Paediatr Suppl, 1996. **413**: p. 2-28.
24. Ebbeling, C.B., D.B. Pawlak, and D.S. Ludwig, *Childhood obesity: public-health crisis, common sense cure*. Lancet, 2002. **360**(9331): p. 473-82.
25. Trayhurn, P., *The biology of obesity*. Proc Nutr Soc, 2005. **64**(1): p. 31-8.
26. Booth, F.W. and M.J. Laye, *Lack of adequate appreciation of physical exercise's complexities can pre-empt appropriate design and interpretation in scientific discovery*. J Physiol, 2009. **587**(Pt 23): p. 5527-39.
27. Kraus, W.E., et al., *Effects of the amount and intensity of exercise on plasma lipoproteins*. N Engl J Med, 2002. **347**(19): p. 1483-92.

28. Shrestha, P. and L. Ghimire, *A review about the effect of life style modification on diabetes and quality of life*. Glob J Health Sci, 2012. **4**(6): p. 185-90.
29. Tschentscher, M., D. Niederseer, and J. Niebauer, *Health benefits of nordic walking: a systematic review*. Am J Prev Med, 2013. **44**(1): p. 76-84.
30. Lightfoot, A., A. McArdle, and R.D. Griffiths, *Muscle in defense*. Crit Care Med, 2009. **37**(10 Suppl): p. S384-90.
31. Pedersen, B.K., *Exercise-induced myokines and their role in chronic diseases*. Brain Behav Immun, 2011. **25**(5): p. 811-6.
32. Handschin, C. and B.M. Spiegelman, *The role of exercise and PGC1alpha in inflammation and chronic disease*. Nature, 2008. **454**(7203): p. 463-9.
33. Redinger, R.N., *Fat storage and the biology of energy expenditure*. Transl Res, 2009. **154**(2): p. 52-60.
34. Woods, S.C., *Signals that influence food intake and body weight*. Physiol Behav, 2005. **86**(5): p. 709-16.
35. Sam, A.H., et al., *The role of the gut/brain axis in modulating food intake*. Neuropharmacology, 2012. **63**(1): p. 46-56.
36. Stellar, E., *The physiology of motivation*. Psychol Rev, 1954. **61**(1): p. 5-22.
37. Elmquist, J.K., C.F. Elias, and C.B. Saper, *From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight*. Neuron, 1999. **22**(2): p. 221-32.
38. Yu, J.H. and M.S. Kim, *Molecular mechanisms of appetite regulation*. Diabetes Metab J, 2012. **36**(6): p. 391-8.
39. Gooley, J.J., A. Schomer, and C.B. Saper, *The dorsomedial hypothalamic nucleus is critical for the expression of food-entrainable circadian rhythms*. Nat Neurosci, 2006. **9**(3): p. 398-407.
40. Foster, M.T., C.K. Song, and T.J. Bartness, *Hypothalamic paraventricular nucleus lesion involvement in the sympathetic control of lipid mobilization*. Obesity (Silver Spring), 2010. **18**(4): p. 682-9.
41. Suzuki, K., et al., *The role of gut hormones and the hypothalamus in appetite regulation*. Endocr J, 2010. **57**(5): p. 359-72.
42. Stefan, N. and H.U. Haring, *The role of hepatokines in metabolism*. Nat Rev Endocrinol, 2013.
43. Cuenca, E.M., *Fundamentos de Fisiología*. 1 ed2006: Editorial Paraninfo.
44. Misu, H. and T. Takamura, *[Regulation of glucose metabolism by liver-derived secretory proteins 'hepatokines']*. Nihon Rinsho, 2012. **70 Suppl 3**: p. 207-11.
45. McGowan, M.K., et al., *Effects of chronic intrahypothalamic infusion of insulin on food intake and diurnal meal patterning in the rat*. Behav Neurosci, 1990. **104**(2): p. 373-85.
46. Strader, A.D. and S.C. Woods, *Gastrointestinal hormones and food intake*. Gastroenterology, 2005. **128**(1): p. 175-91.
47. Lim, C.T., B. Kola, and M. Korbonits, *The ghrelin/GOAT/GHS-R system and energy metabolism*. Rev Endocr Metab Disord, 2011. **12**(3): p. 173-86.
48. Item, F. and D. Konrad, *Visceral fat and metabolic inflammation: the portal theory revisited*. Obes Rev, 2012. **13 Suppl 2**: p. 30-9.
49. Rhoades, R. and D.R. Bell, *Medical physiology : principles for clinical medicine*. 4th ed2013, Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins. xvi, 819 p.
50. Kronenberg, H. and R.H. Williams, *Williams textbook of endocrinology*. 11th ed2008, Philadelphia: Saunders/Elsevier. xix, 1911 p.
51. Scheen, A.J. and F.H. Luyckx, *Obesity and liver disease*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2002. **16**(4): p. 703-16.
52. Basu, A., et al., *Systemic and regional free fatty acid metabolism in type 2 diabetes*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2001. **280**(6): p. E1000-6.
53. Despres, J.P. and I. Lemieux, *Abdominal obesity and metabolic syndrome*. Nature, 2006. **444**(7121): p. 881-7.

54. Fabbrini, E., S. Sullivan, and S. Klein, *Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic, and clinical implications*. Hepatology, 2010. **51**(2): p. 679-89.
55. Fabbrini, E., et al., *Intrahepatic fat, not visceral fat, is linked with metabolic complications of obesity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(36): p. 15430-5.
56. Saltiel, A.R. and C.R. Kahn, *Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism*. Nature, 2001. **414**(6865): p. 799-806.
57. Denecke, B., et al., *Tissue distribution and activity testing suggest a similar but not identical function of fetuin-B and fetuin-A*. Biochem J, 2003. **376**(Pt 1): p. 135-45.
58. Mathews, S.T., et al., *Improved insulin sensitivity and resistance to weight gain in mice null for the Ahsg gene*. Diabetes, 2002. **51**(8): p. 2450-8.
59. Dahlman, I., et al., *alpha2-Heremans-Schmid glycoprotein gene polymorphisms are associated with adipocyte insulin action*. Diabetologia, 2004. **47**(11): p. 1974-9.
60. Siddiq, A., et al., *A synonymous coding polymorphism in the alpha2-Heremans-schmid glycoprotein gene is associated with type 2 diabetes in French Caucasians*. Diabetes, 2005. **54**(8): p. 2477-81.
61. Stefan, N., et al., *Alpha2-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin-A is associated with insulin resistance and fat accumulation in the liver in humans*. Diabetes Care, 2006. **29**(4): p. 853-7.
62. Mori, K., et al., *Association of serum fetuin-A with insulin resistance in type 2 diabetic and nondiabetic subjects*. Diabetes Care, 2006. **29**(2): p. 468.
63. Ix, J.H., et al., *Association between human fetuin-A and the metabolic syndrome: data from the Heart and Soul Study*. Circulation, 2006. **113**(14): p. 1760-7.
64. Hennige, A.M., et al., *Fetuin-A induces cytokine expression and suppresses adiponectin production*. PLoS One, 2008. **3**(3): p. e1765.
65. Siiteri, P.K., *Adipose tissue as a source of hormones*. Am J Clin Nutr, 1987. **45**(1 Suppl): p. 277-82.
66. Zhang, Y., et al., *Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue*. Nature, 1994. **372**(6505): p. 425-32.
67. Casteilla, L., et al., *Choosing an adipose tissue depot for sampling: factors in selection and depot specificity*. Methods Mol Biol, 2008. **456**: p. 23-38.
68. Harwood, H.J., Jr., *The adipocyte as an endocrine organ in the regulation of metabolic homeostasis*. Neuropharmacology, 2012. **63**(1): p. 57-75.
69. Cook, A. and C. Cowan, *Adipose*, in *StemBook2008*: Cambridge (MA).
70. Stephens, J.M., *The fat controller: adipocyte development*. PLoS Biol, 2012. **10**(11): p. e1001436.
71. Petrovic, N., et al., *Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) 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, 2010. **285**(10): p. 7153-64.
72. Stephens, M., M. Ludgate, and D.A. Rees, *Brown fat and obesity: the next big thing?* Clin Endocrinol (Oxf), 2011. **74**(6): p. 661-70.
73. Lee, M.J., Y. Wu, and S.K. Fried, *Adipose tissue heterogeneity: Implication of depot differences in adipose tissue for obesity complications*. Mol Aspects Med, 2013. **34**(1): p. 1-11.
74. Sell, H., Y. Deshaies, and D. Richard, *The brown adipocyte: update on its metabolic role*. Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36**(11): p. 2098-104.
75. Cannon, B. and J. Nedergaard, *Brown adipose tissue: function and physiological significance*. Physiol Rev, 2004. **84**(1): p. 277-359.
76. Cousin, B., et al., *Occurrence of brown adipocytes in rat white adipose tissue: molecular and morphological characterization*. J Cell Sci, 1992. **103** (Pt 4): p. 931-42.
77. Bostrom, P., et al., *A PGC1-alpha-dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis*. Nature, 2012. **481**(7382): p. 463-8.

78. Wu, J., et al., *Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human*. *Cell*, 2012. **150**(2): p. 366-76.
79. Sethi, J.K. and A.J. Vidal-Puig, *Thematic review series: adipocyte biology. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation*. *J Lipid Res*, 2007. **48**(6): p. 1253-62.
80. Bjorndal, B., et al., *Different adipose depots: their role in the development of metabolic syndrome and mitochondrial response to hypolipidemic agents*. *J Obes*, 2011. **2011**: p. 490650.
81. Bautista, C.J., P.M. Martinez-Samayoa, and E. Zambrano, *Sex steroids regulation of appetitive behavior*. *Mini Rev Med Chem*, 2012. **12**(11): p. 1107-18.
82. Toyoda, M., et al., *Characterization and comparison of adipose tissue-derived cells from human subcutaneous and omental adipose tissues*. *Cell Biochem Funct*, 2009. **27**(7): p. 440-7.
83. Shi, H. and D.J. Clegg, *Sex differences in the regulation of body weight*. *Physiol Behav*, 2009. **97**(2): p. 199-204.
84. Kershaw, E.E. and J.S. Flier, *Adipose tissue as an endocrine organ*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004. **89**(6): p. 2548-56.
85. Bluher, M., *Clinical relevance of adipokines*. *Diabetes Metab J*, 2012. **36**(5): p. 317-27.
86. Tartaglia, L.A., et al., *Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R*. *Cell*, 1995. **83**(7): p. 1263-71.
87. Munzberg, H., et al., *Leptin receptor action and mechanisms of leptin resistance*. *Cell Mol Life Sci*, 2005. **62**(6): p. 642-52.
88. Feng, H., et al., *The role of leptin in obesity and the potential for leptin replacement therapy*. *Endocrine*, 2012.
89. Adamczak, M. and A. Wiecek, *The adipose tissue as an endocrine organ*. *Semin Nephrol*, 2013. **33**(1): p. 2-13.
90. Turer, A.T. and P.E. Scherer, *Adiponectin: mechanistic insights and clinical implications*. *Diabetologia*, 2012. **55**(9): p. 2319-26.
91. Sahin-Efe, A., F. Katsikeris, and C.S. Mantzoros, *Advances in adipokines*. *Metabolism*, 2012. **61**(12): p. 1659-65.
92. Rajala, M.W., et al., *Regulation of resistin expression and circulating levels in obesity, diabetes, and fasting*. *Diabetes*, 2004. **53**(7): p. 1671-9.
93. Silha, J.V., et al., *Plasma resistin, adiponectin and leptin levels in lean and obese subjects: correlations with insulin resistance*. *Eur J Endocrinol*, 2003. **149**(4): p. 331-5.
94. Heilbronn, L.K., et al., *Relationship between serum resistin concentrations and insulin resistance in nonobese, obese, and obese diabetic subjects*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004. **89**(4): p. 1844-8.
95. Way, J.M., et al., *Adipose tissue resistin expression is severely suppressed in obesity and stimulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(28): p. 25651-3.
96. Lee, S.E. and H.S. Kim, *Human resistin in cardiovascular disease*. *J Smooth Muscle Res*, 2012. **48**(1): p. 27-35.
97. Nedergaard, J., T. Bengtsson, and B. Cannon, *Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2007. **293**(2): p. E444-52.
98. Saito, M., et al., *High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of cold exposure and adiposity*. *Diabetes*, 2009. **58**(7): p. 1526-31.
99. Feng, B., T. Zhang, and H. Xu, *Human adipose dynamics and metabolic health*. *Ann N Y Acad Sci*, 2013.
100. Cypess, A.M., et al., *Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans*. *N Engl J Med*, 2009. **360**(15): p. 1509-17.

101. Enerback, S., *Human brown adipose tissue*. Cell Metab, 2010. **11**(4): p. 248-52.
102. de Lange, P., et al., *Fuel economy in food-deprived skeletal muscle: signaling pathways and regulatory mechanisms*. FASEB J, 2007. **21**(13): p. 3431-41.
103. Schiaffino, S. and C. Reggiani, *Fiber types in mammalian skeletal muscles*. Physiol Rev, 2011. **91**(4): p. 1447-531.
104. Pette, D., H. Peuker, and R.S. Staron, *The impact of biochemical methods for single muscle fibre analysis*. Acta Physiol Scand, 1999. **166**(4): p. 261-77.
105. Scott, W., J. Stevens, and S.A. Binder-Macleod, *Human skeletal muscle fiber type classifications*. Phys Ther, 2001. **81**(11): p. 1810-6.
106. Zierath, J.R. and J.A. Hawley, *Skeletal muscle fiber type: influence on contractile and metabolic properties*. PLoS Biol, 2004. **2**(10): p. e348.
107. Matsakas, A. and K. Patel, *Intracellular signalling pathways regulating the adaptation of skeletal muscle to exercise and nutritional changes*. Histol Histopathol, 2009. **24**(2): p. 209-22.
108. Pette, D., *Historical Perspectives: plasticity of mammalian skeletal muscle*. J Appl Physiol, 2001. **90**(3): p. 1119-24.
109. Pedersen, B.K. and C.P. Fischer, *Beneficial health effects of exercise--the role of IL-6 as a myokine*. Trends Pharmacol Sci, 2007. **28**(4): p. 152-6.
110. Walsh, K., *Adipokines, myokines and cardiovascular disease*. Circ J, 2009. **73**(1): p. 13-8.
111. Pedersen, B.K., *The diseasome of physical inactivity--and the role of myokines in muscle--fat cross talk*. J Physiol, 2009. **587**(Pt 23): p. 5559-68.
112. Petersen, E.W., et al., *Acute IL-6 treatment increases fatty acid turnover in elderly humans in vivo and in tissue culture in vitro*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2005. **288**(1): p. E155-62.
113. Carey, A.L., et al., *Interleukin-6 increases insulin-stimulated glucose disposal in humans and glucose uptake and fatty acid oxidation in vitro via AMP-activated protein kinase*. Diabetes, 2006. **55**(10): p. 2688-97.
114. Brandt, C. and B.K. Pedersen, *The role of exercise-induced myokines in muscle homeostasis and the defense against chronic diseases*. J Biomed Biotechnol, 2010. **2010**: p. 520258.
115. Seldin, M.M., et al., *Myonectin (CTRP15), a novel myokine that links skeletal muscle to systemic lipid homeostasis*. J Biol Chem, 2012. **287**(15): p. 11968-80.
116. Muoio, D.M. and T.R. Koves, *Skeletal muscle adaptation to fatty acid depends on coordinated actions of the PPARs and PGC1 alpha: implications for metabolic disease*. Appl Physiol Nutr Metab, 2007. **32**(5): p. 874-83.
117. Canto, C. and J. Auwerx, *PGC-1alpha, SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure*. Curr Opin Lipidol, 2009. **20**(2): p. 98-105.
118. Eckardt, K., A. Taube, and J. Eckel, *Obesity-associated insulin resistance in skeletal muscle: role of lipid accumulation and physical inactivity*. Rev Endocr Metab Disord, 2011. **12**(3): p. 163-72.
119. Wenz, T., et al., *Increased muscle PGC-1alpha expression protects from sarcopenia and metabolic disease during aging*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(48): p. 20405-10.
120. Kornfeld, J.W. and J.C. Bruning, *MyomiRs-133a/b turn off the heat*. Nat Cell Biol, 2012. **14**(12): p. 1248-9.
121. Cunha, A., *Basic research: Irisin--behind the benefits of exercise*. Nat Rev Endocrinol, 2012. **8**(4): p. 195.
122. Sanchis-Gomar, F., et al., *Irisin: a new potential hormonal target for the treatment of obesity and type 2 diabetes*. J Diabetes, 2012. **4**(3): p. 196.
123. Villarroya, F., *Irisin, turning up the heat*. Cell Metab, 2012. **15**(3): p. 277-8.
124. Kelly, D.P., *Medicine. Irisin, light my fire*. Science, 2012. **336**(6077): p. 42-3.

125. Huh, J.Y., et al., *FNDC5 and irisin in humans: I. Predictors of circulating concentrations in serum and plasma and II. mRNA expression and circulating concentrations in response to weight loss and exercise*. *Metabolism*, 2012. **61**(12): p. 1725-38.
126. Stengel, A., et al., *Circulating levels of irisin in patients with anorexia nervosa and different stages of obesity--correlation with body mass index*. *Peptides*, 2013. **39**: p. 125-30.
127. Moreno-Navarrete, J.M., et al., *Irisin Is Expressed and Produced by Human Muscle and Adipose Tissue in Association With Obesity and Insulin Resistance*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2013.
128. Cinti, S., *The adipose organ at a glance*. *Dis Model Mech*, 2012. **5**(5): p. 588-94.
129. Pedersen, B.K., et al., *The metabolic role of IL-6 produced during exercise: is IL-6 an exercise factor?* *Proc Nutr Soc*, 2004. **63**(2): p. 263-7.
130. Trayhurn, P., C.A. Drevon, and J. Eckel, *Secreted proteins from adipose tissue and skeletal muscle - adipokines, myokines and adipose/muscle cross-talk*. *Arch Physiol Biochem*, 2011. **117**(2): p. 47-56.
131. Argiles, J.M., et al., *Cross-talk between skeletal muscle and adipose tissue: a link with obesity?* *Med Res Rev*, 2005. **25**(1): p. 49-65.
132. Pedersen, B.K. and M.A. Febbraio, *Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6*. *Physiol Rev*, 2008. **88**(4): p. 1379-406.
133. Pavlou, M.P. and E.P. Diamandis, *The cancer cell secretome: a good source for discovering biomarkers?* *J Proteomics*, 2010. **73**(10): p. 1896-906.
134. Skalnikova, H., et al., *Mapping of the secretome of primary isolates of mammalian cells, stem cells and derived cell lines*. *Proteomics*, 2011. **11**(4): p. 691-708.
135. van Vliet, C., et al., *Intracellular sorting and transport of proteins*. *Prog Biophys Mol Biol*, 2003. **83**(1): p. 1-45.
136. Nickel, W. and C. Rabouille, *Mechanisms of regulated unconventional protein secretion*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009. **10**(2): p. 148-55.
137. Aoki, N., et al., *Identification and characterization of microvesicles secreted by 3T3-L1 adipocytes: redox- and hormone-dependent induction of milk fat globule-epidermal growth factor 8-associated microvesicles*. *Endocrinology*, 2007. **148**(8): p. 3850-62.
138. Nielsen, H., et al., *Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites*. *Protein Eng*, 1997. **10**(1): p. 1-6.
139. Emanuelsson, O., et al., *Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools*. *Nat Protoc*, 2007. **2**(4): p. 953-71.
140. Bendtsen, J.D., et al., *Feature-based prediction of non-classical and leaderless protein secretion*. *Protein Eng Des Sel*, 2004. **17**(4): p. 349-56.
141. Tyers, M. and M. Mann, *From genomics to proteomics*. *Nature*, 2003. **422**(6928): p. 193-7.
142. Chiou, S.H. and C.Y. Wu, *Clinical proteomics: current status, challenges, and future perspectives*. *Kaohsiung J Med Sci*, 2011. **27**(1): p. 1-14.
143. Sanchez, J.C., et al., *The mouse SWISS-2D PAGE database: a tool for proteomics study of diabetes and obesity*. *Proteomics*, 2001. **1**(1): p. 136-63.
144. Yang, S. and C.M. Huang, *Recent advances in protein profiling of tissues and tissue fluids*. *Expert Rev Proteomics*, 2007. **4**(4): p. 515-29.
145. Pardo, M., R.A. Dwek, and N. Zitzmann, *Proteomics in uveal melanoma research: opportunities and challenges in biomarker discovery*. *Expert Rev Proteomics*, 2007. **4**(2): p. 273-86.
146. Wang, P., et al., *Profiling of the secreted proteins during 3T3-L1 adipocyte differentiation leads to the identification of novel adipokines*. *Cell Mol Life Sci*, 2004. **61**(18): p. 2405-17.
147. Brewis, I.A. and P. Brennan, *Proteomics technologies for the global identification and quantification of proteins*. *Adv Protein Chem Struct Biol*, 2010. **80**: p. 1-44.

148. Pardo, M., et al., *Obesidomics: contribution of adipose tissue secretome analysis to obesity research*. *Endocrine*, 2012. **41**(3): p. 374-83.
149. Roelofsen, H., et al., *Comparison of isotope-labeled amino acid incorporation rates (CILAIR) provides a quantitative method to study tissue secretomes*. *Mol Cell Proteomics*, 2009. **8**(2): p. 316-24.
150. Alvarez-Llamas, G., et al., *Characterization of the human visceral adipose tissue secretome*. *Mol Cell Proteomics*, 2007. **6**(4): p. 589-600.
151. Chen, X., et al., *Proteomic characterization of thiazolidinedione regulation of obese adipose secretome in Zucker obese rats*. *Proteomics Clin Appl*, 2009. **3**(9): p. 1099-111.
152. Chen, X., et al., *Quantitative proteomic analysis of the secretory proteins from rat adipose cells using a 2D liquid chromatography-MS/MS approach*. *J Proteome Res*, 2005. **4**(2): p. 570-7.
153. Famulla, S., et al., *Pigment epithelium-derived factor (PEDF) is one of the most abundant proteins secreted by human adipocytes and induces insulin resistance and inflammatory signaling in muscle and fat cells*. *Int J Obes (Lond)*, 2011. **35**(6): p. 762-72.
154. Lamers, D., et al., *Dipeptidyl peptidase 4 is a novel adipokine potentially linking obesity to the metabolic syndrome*. *Diabetes*, 2011. **60**(7): p. 1917-25.
155. Zvonic, S., et al., *Secretome of primary cultures of human adipose-derived stem cells: modulation of serpins by adipogenesis*. *Mol Cell Proteomics*, 2007. **6**(1): p. 18-28.
156. Lee, M.J., et al., *Proteomic analysis of tumor necrosis factor-alpha-induced secretome of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells*. *J Proteome Res*, 2010. **9**(4): p. 1754-62.
157. Mutch, D.M., et al., *Using gene expression to predict the secretome of differentiating human preadipocytes*. *Int J Obes (Lond)*, 2009. **33**(3): p. 354-63.
158. Chiellini, C., et al., *Characterization of human mesenchymal stem cell secretome at early steps of adipocyte and osteoblast differentiation*. *BMC Mol Biol*, 2008. **9**: p. 26.
159. Molina, H., et al., *Temporal profiling of the adipocyte proteome during differentiation using a five-plex SILAC based strategy*. *J Proteome Res*, 2009. **8**(1): p. 48-58.
160. Zhong, J., et al., *Temporal profiling of the secretome during adipogenesis in humans*. *J Proteome Res*, 2010. **9**(10): p. 5228-38.
161. Kim, J., et al., *Comparative analysis of the secretory proteome of human adipose stromal vascular fraction cells during adipogenesis*. *Proteomics*, 2010. **10**(3): p. 394-405.
162. Billon, N., M.C. Monteiro, and C. Dani, *Developmental origin of adipocytes: new insights into a pending question*. *Biol Cell*, 2008. **100**(10): p. 563-75.
163. Joe, A.W., et al., *Depot-specific differences in adipogenic progenitor abundance and proliferative response to high-fat diet*. *Stem Cells*, 2009. **27**(10): p. 2563-70.
164. Peinado, J.R., et al., *The stromal-vascular fraction of adipose tissue contributes to major differences between subcutaneous and visceral fat depots*. *Proteomics*, 2010. **10**(18): p. 3356-66.
165. Perez-Perez, R., et al., *Differential proteomics of omental and subcutaneous adipose tissue reflects their unlike biochemical and metabolic properties*. *J Proteome Res*, 2009. **8**(4): p. 1682-93.
166. Hoggard, N., et al., *Using gene expression to predict differences in the secretome of human omental vs. subcutaneous adipose tissue*. *Obesity (Silver Spring)*, 2012. **20**(6): p. 1158-67.
167. Hocking, S.L., et al., *Intrinsic depot-specific differences in the secretome of adipose tissue, preadipocytes, and adipose tissue-derived microvascular endothelial cells*. *Diabetes*, 2010. **59**(12): p. 3008-16.
168. Yoon, J.H., et al., *Comparative proteomic analysis of the insulin-induced L6 myotube secretome*. *Proteomics*, 2009. **9**(1): p. 51-60.

169. Yoon, J.H., et al., *Proteomic analysis of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)-induced L6 myotube secretome reveals novel TNF-alpha-dependent myokines in diabetic skeletal muscle*. J Proteome Res, 2011. **10**(12): p. 5315-25.
170. Chan, X.C., J.C. McDermott, and K.W. Siu, *Identification of secreted proteins during skeletal muscle development*. J Proteome Res, 2007. **6**(2): p. 698-710.
171. Chan, C.Y., et al., *Identification of differentially regulated secretome components during skeletal myogenesis*. Mol Cell Proteomics, 2011. **10**(5): p. M110 004804.
172. Henningsen, J., et al., *Dynamics of the skeletal muscle secretome during myoblast differentiation*. Mol Cell Proteomics, 2010. **9**(11): p. 2482-96.
173. Norheim, F., et al., *Proteomic identification of secreted proteins from human skeletal muscle cells and expression in response to strength training*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2011. **301**(5): p. E1013-21.
174. Le Bihan, M.C., et al., *In-depth analysis of the secretome identifies three major independent secretory pathways in differentiating human myoblasts*. J Proteomics, 2012. **77**: p. 344-56.
175. Spear, N. and W. Hill, *Methodological note: Excessive weight loss in rats living in activity wheels*. Psychological Reports, 1962. **11**: p. 2.
176. Routtenberg, A. and A.W. Kuznesof, *Self-starvation of rats living in activity wheels on a restricted feeding schedule*. J Comp Physiol Psychol, 1967. **64**(3): p. 414-21.
177. Li, S., et al., *Assessment of diet-induced obese rats as an obesity model by comparative functional genomics*. Obesity (Silver Spring), 2008. **16**(4): p. 811-8.
178. Phillips, M.S., et al., *Leptin receptor missense mutation in the fatty Zucker rat*. Nat Genet, 1996. **13**(1): p. 18-9.
179. Etgen, G.J. and B.A. Oldham, *Profiling of Zucker diabetic fatty rats in their progression to the overt diabetic state*. Metabolism, 2000. **49**(5): p. 684-8.
180. Todaro, G.J., K. Nilausen, and H. Green, *Growth Properties of Polyoma Virus-Induced Hamster Tumor Cells*. Cancer Res, 1963. **23**: p. 825-32.
181. Green, H. and M. Meuth, *An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture*. Cell, 1974. **3**(2): p. 127-33.
182. Yaffe, D., *Retention of differentiation potentialities during prolonged cultivation of myogenic cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1968. **61**(2): p. 477-83.
183. Nadal-Ginard, B., *Commitment, fusion and biochemical differentiation of a myogenic cell line in the absence of DNA synthesis*. Cell, 1978. **15**(3): p. 855-64.
184. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
185. Matthews, D.R., et al., *Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man*. Diabetologia, 1985. **28**(7): p. 412-9.
186. Bendtsen, J.D., et al., *Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0*. J Mol Biol, 2004. **340**(4): p. 783-95.
187. Haglund, A.C., B. Ek, and P. Ek, *Phosphorylation of human plasma alpha2-Heremans-Schmid glycoprotein (human fetuin) in vivo*. Biochem J, 2001. **357**(Pt 2): p. 437-45.
188. Matsuzawa, Y., *The role of fat topology in the risk of disease*. Int J Obes (Lond), 2008. **32 Suppl 7**: p. S83-92.
189. Bouassida, A., et al., *Review on leptin and adiponectin responses and adaptations to acute and chronic exercise*. Br J Sports Med, 2010. **44**(9): p. 620-30.
190. Pedersen, B.K. and M.A. Febbraio, *Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ*. Nat Rev Endocrinol, 2012. **8**(8): p. 457-65.
191. Zhou, Q., et al., *Evidence for adipose-muscle cross talk: opposing regulation of muscle proteolysis by adiponectin and Fatty acids*. Endocrinology, 2007. **148**(12): p. 5696-705.
192. Ginter, E. and V. Simko, *Type 2 diabetes mellitus, pandemic in 21st century*. Adv Exp Med Biol, 2012. **771**: p. 42-50.

193. Ploog, D.W. and K.M. Pirke, *Psychobiology of anorexia nervosa*. Psychol Med, 1987. **17**(4): p. 843-59.
194. Casper, R.C., E.L. Sullivan, and L. Tecott, *Relevance of animal models to human eating disorders and obesity*. Psychopharmacology (Berl), 2008. **199**(3): p. 313-29.
195. Boakes, R.A. and I. Juraskova, *The role of drinking in the suppression of food intake by recent activity*. Behav Neurosci, 2001. **115**(3): p. 718-30.
196. Holloszy, J.O. and E.F. Coyle, *Adaptations of skeletal muscle to endurance exercise and their metabolic consequences*. J Appl Physiol, 1984. **56**(4): p. 831-8.
197. Ruhl, C.E., et al., *Body mass index and serum leptin concentration independently estimate percentage body fat in older adults*. Am J Clin Nutr, 2007. **85**(4): p. 1121-6.
198. Ballauff, A., et al., *Serum leptin and gonadotropin levels in patients with anorexia nervosa during weight gain*. Mol Psychiatry, 1999. **4**(1): p. 71-5.
199. Hebebrand, J., et al., *Leptin levels in patients with anorexia nervosa are reduced in the acute stage and elevated upon short-term weight restoration*. Mol Psychiatry, 1997. **2**(4): p. 330-4.
200. Hebebrand, J., et al., *Plasma concentrations of obese protein in anorexia nervosa*. Lancet, 1995. **346**(8990): p. 1624-5.
201. Hebebrand, J., et al., *Hyperactivity in patients with anorexia nervosa and in semistarved rats: evidence for a pivotal role of hypoleptinemia*. Physiol Behav, 2003. **79**(1): p. 25-37.
202. Takeda, H., et al., *Pathophysiologic characteristics of the activity-stress paradigm in animal models: inhibitory effect of glucose on these responses*. Nutr Rev, 2003. **61**(5 Pt 2): p. S75-9.
203. Dostalova, I., et al., *Increased insulin sensitivity in patients with anorexia nervosa: the role of adipocytokines*. Physiol Res, 2007. **56**(5): p. 587-94.
204. Gesta, S., Y.H. Tseng, and C.R. Kahn, *Developmental origin of fat: tracking obesity to its source*. Cell, 2007. **131**(2): p. 242-56.
205. Montague, C.T., et al., *Depot- and sex-specific differences in human leptin mRNA expression: implications for the control of regional fat distribution*. Diabetes, 1997. **46**(3): p. 342-7.
206. Orel, M., et al., *Gender differences in tumor necrosis factor alpha and leptin secretion from subcutaneous and visceral fat tissue*. Physiol Res, 2004. **53**(5): p. 501-5.
207. Van Harmelen, V., et al., *Leptin secretion from subcutaneous and visceral adipose tissue in women*. Diabetes, 1998. **47**(6): p. 913-7.
208. Monteleone, P., et al., *Plasma obestatin, ghrelin, and ghrelin/obestatin ratio are increased in underweight patients with anorexia nervosa but not in symptomatic patients with bulimia nervosa*. J Clin Endocrinol Metab, 2008. **93**(11): p. 4418-21.
209. Attele, A.S., Z.Q. Shi, and C.S. Yuan, *Leptin, gut, and food intake*. Biochem Pharmacol, 2002. **63**(9): p. 1579-83.
210. Olszewski, P.K., H.B. Schioth, and A.S. Levine, *Ghrelin in the CNS: from hunger to a rewarding and memorable meal?* Brain Res Rev, 2008. **58**(1): p. 160-70.
211. Anubhuti and S. Arora, *Leptin and its metabolic interactions: an update*. Diabetes Obes Metab, 2008. **10**(11): p. 973-93.
212. De Vriese, C. and C. Delporte, *Ghrelin: a new peptide regulating growth hormone release and food intake*. Int J Biochem Cell Biol, 2008. **40**(8): p. 1420-4.
213. Fruhbeck, G., J. Gomez-Ambrosi, and J.A. Martinez, *Pre- and postprandial expression of the leptin receptor splice variants OB-Ra and OB-Rb in murine peripheral tissues*. Physiol Res, 1999. **48**(3): p. 189-95.
214. Rodriguez, A., et al., *Acylated and desacyl ghrelin stimulate lipid accumulation in human visceral adipocytes*. Int J Obes (Lond), 2009. **33**(5): p. 541-52.
215. Tsubone, T., et al., *Ghrelin regulates adiposity in white adipose tissue and UCP1 mRNA expression in brown adipose tissue in mice*. Regul Pept, 2005. **130**(1-2): p. 97-103.

216. Zhang, W., et al., *Inhibition of adipogenesis by ghrelin*. Mol Biol Cell, 2004. **15**(5): p. 2484-91.
217. Davies, J.S., et al., *Ghrelin induces abdominal obesity via GHS-R-dependent lipid retention*. Mol Endocrinol, 2009. **23**(6): p. 914-24.
218. Speakman, J., et al., *The contribution of animal models to the study of obesity*. Lab Anim, 2008. **42**(4): p. 413-32.
219. Bray, G.A., *The Zucker-fatty rat: a review*. Fed Proc, 1977. **36**(2): p. 148-53.
220. Bessesen, D.H., S. Bull, and M.A. Cornier, *Trafficking of dietary fat and resistance to obesity*. Physiol Behav, 2008. **94**(5): p. 681-8.
221. Clegg, D.J., et al., *Reduced anorexic effects of insulin in obesity-prone rats fed a moderate-fat diet*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2005. **288**(4): p. R981-6.
222. Buettner, R., J. Scholmerich, and L.C. Bollheimer, *High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents*. Obesity (Silver Spring), 2007. **15**(4): p. 798-808.
223. Remick, A.K., J. Polivy, and P. Pliner, *Internal and external moderators of the effect of variety on food intake*. Psychol Bull, 2009. **135**(3): p. 434-51.
224. Winzell, M.S. and B. Ahren, *The high-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes*. Diabetes, 2004. **53** Suppl 3: p. S215-9.
225. Staiger, H., et al., *Relationship of serum adiponectin and leptin concentrations with body fat distribution in humans*. Obes Res, 2003. **11**(3): p. 368-72.
226. Borel, A.L., et al., *Visceral and not subcutaneous abdominal adiposity reduction drives the benefits of a 1-year lifestyle modification program*. Obesity (Silver Spring), 2012. **20**(6): p. 1223-33.
227. Gomez, G., et al., *Influence of a long-term high-fat diet on ghrelin secretion and ghrelin-induced food intake in rats*. Regul Pept, 2012. **173**(1-3): p. 60-3.
228. Lee, H.M., et al., *Ghrelin, a new gastrointestinal endocrine peptide that stimulates insulin secretion: enteric distribution, ontogeny, influence of endocrine, and dietary manipulations*. Endocrinology, 2002. **143**(1): p. 185-90.
229. le Roux, C.W., et al., *Postprandial plasma ghrelin is suppressed proportional to meal calorie content in normal-weight but not obese subjects*. J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**(2): p. 1068-71.
230. Erdmann, J., F. Lippl, and V. Schusdziarra, *Differential effect of protein and fat on plasma ghrelin levels in man*. Regul Pept, 2003. **116**(1-3): p. 101-7.
231. Porter, S.A., et al., *Abdominal subcutaneous adipose tissue: a protective fat depot?* Diabetes Care, 2009. **32**(6): p. 1068-75.
232. Rhodes, D.H., et al., *Adipose tissue-specific modulation of galectin expression in lean and obese mice: evidence for regulatory function*. Obesity (Silver Spring), 2013. **21**(2): p. 310-9.
233. Kanda, H., et al., *MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity*. J Clin Invest, 2006. **116**(6): p. 1494-505.
234. Gaidhu, M.P., et al., *Dysregulation of lipolysis and lipid metabolism in visceral and subcutaneous adipocytes by high-fat diet: role of ATGL, HSL, and AMPK*. Am J Physiol Cell Physiol, 2010. **298**(4): p. C961-71.
235. Szalowska, E., et al., *Fractional factorial design for optimization of the SELDI protocol for human adipose tissue culture media*. Biotechnol Prog, 2007. **23**(1): p. 217-24.
236. Pardo, M., et al., *Biomarker discovery from uveal melanoma secretomes: identification of gp100 and cathepsin D in patient serum*. J Proteome Res, 2007. **6**(7): p. 2802-11.
237. Hathout, Y., *Approaches to the study of the cell secretome*. Expert Rev Proteomics, 2007. **4**(2): p. 239-48.

238. Butler, G.S. and C.M. Overall, *Proteomic identification of multitasking proteins in unexpected locations complicates drug targeting*. Nat Rev Drug Discov, 2009. **8**(12): p. 935-48.
239. Gilmore, T.D., *Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives*. Oncogene, 2006. **25**(51): p. 6680-4.
240. Prusty, D., et al., *Activation of MEK/ERK signaling promotes adipogenesis by enhancing peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) and C/EBPalpha gene expression during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes*. J Biol Chem, 2002. **277**(48): p. 46226-32.
241. Ibrahim, M.M., *Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences*. Obes Rev, 2010. **11**(1): p. 11-8.
242. Ramis, J.M., et al., *Carboxypeptidase E and thrombospondin-1 are differently expressed in subcutaneous and visceral fat of obese subjects*. Cell Mol Life Sci, 2002. **59**(11): p. 1960-71.
243. Pantanetti, P., et al., *Adipose tissue as an endocrine organ? A review of recent data related to cardiovascular complications of endocrine dysfunctions*. Clin Exp Hypertens, 2004. **26**(4): p. 387-98.
244. Yasue, S., et al., *Adipose tissue-specific regulation of angiotensinogen in obese humans and mice: impact of nutritional status and adipocyte hypertrophy*. Am J Hypertens, 2010. **23**(4): p. 425-31.
245. Maeda, K., et al., *Analysis of an expression profile of genes in the human adipose tissue*. Gene, 1997. **190**(2): p. 227-35.
246. Arner, P., et al., *Defective insulin receptor tyrosine kinase in human skeletal muscle in obesity and type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus*. Diabetologia, 1987. **30**(6): p. 437-40.
247. Comi, R.J., G. Grunberger, and P. Gorden, *Relationship of insulin binding and insulin-stimulated tyrosine kinase activity is altered in type II diabetes*. J Clin Invest, 1987. **79**(2): p. 453-62.
248. Cefalu, W.T., et al., *Contribution of visceral fat mass to the insulin resistance of aging*. Metabolism, 1995. **44**(7): p. 954-9.
249. Raji, A., et al., *Body fat distribution and insulin resistance in healthy Asian Indians and Caucasians*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(11): p. 5366-71.
250. Sironi, A.M., et al., *Visceral fat in hypertension: influence on insulin resistance and beta-cell function*. Hypertension, 2004. **44**(2): p. 127-33.
251. Ismail, N.A., et al., *Fetuin-A levels in obesity: differences in relation to metabolic syndrome and correlation with clinical and laboratory variables*. Arch Med Sci, 2012. **8**(5): p. 826-33.
252. Choi, K.M., et al., *The effects of caloric restriction on Fetuin-A and cardiovascular risk factors in rats and humans: a randomized controlled trial*. Clin Endocrinol (Oxf), 2012.
253. Dailey, M.J., K.C. Stingl, and T.H. Moran, *Disassociation between preprandial gut peptide release and food-anticipatory activity*. Endocrinology, 2012. **153**(1): p. 132-42.
254. Poulin, A.M. and E. Timofeeva, *The dynamics of neuronal activation during food anticipation and feeding in the brain of food-entrained rats*. Brain Res, 2008. **1227**: p. 128-41.
255. Schultes, B., et al., *The effect of 6-weeks of aerobic exercise training on serum fetuin-A levels in non-diabetic obese women*. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2010. **118**(10): p. 754-6.
256. Foster, M.T. and M.J. Pagliassotti, *Metabolic alterations following visceral fat removal and expansion: Beyond anatomic location*. Adipocyte, 2012. **1**(4): p. 192-199.
257. O'Connell, J., et al., *The relationship of omental and subcutaneous adipocyte size to metabolic disease in severe obesity*. PLoS One, 2010. **5**(4): p. e9997.

258. Thompson, P.D., *Exercise and physical activity in the prevention and treatment of atherosclerotic cardiovascular disease*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003. **23**(8): p. 1319-21.
259. Catenacci, V.A. and H.R. Wyatt, *The role of physical activity in producing and maintaining weight loss*. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*, 2007. **3**(7): p. 518-29.
260. Knowler, W.C., et al., *Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin*. *N Engl J Med*, 2002. **346**(6): p. 393-403.
261. Gass, M. and B. Dawson-Hughes, *Preventing osteoporosis-related fractures: an overview*. *Am J Med*, 2006. **119**(4 Suppl 1): p. S3-S11.
262. Larson, E.B., et al., *Exercise is associated with reduced risk for incident dementia among persons 65 years of age and older*. *Ann Intern Med*, 2006. **144**(2): p. 73-81.
263. Martinsen, E.W., *Physical activity in the prevention and treatment of anxiety and depression*. *Nord J Psychiatry*, 2008. **62 Suppl 47**: p. 25-9.
264. Vossenaar, M., et al., *Evaluating concordance with the 1997 World Cancer Research Fund/American Institute of Cancer Research cancer prevention guidelines: challenges for the research community*. *Nutr Res Rev*, 2008. **21**(2): p. 189-206.
265. Schiaffino, S., M. Sandri, and M. Murgia, *Activity-dependent signaling pathways controlling muscle diversity and plasticity*. *Physiology (Bethesda)*, 2007. **22**: p. 269-78.
266. Westermeier, R. and T. Naven, *Proteomics in practice : a laboratory manual of proteome analysis 2002*, Weinheim: Wiley-VCH. xxiv, 316 p.
267. Makovicky, P. and F. Jilek, *Short review of some properties of muscular proteins*. *Cesk Fysiol*, 2008. **57**(1): p. 10-4.
268. Wu, A.H. and M.B. Perryman, *Clinical applications of muscle enzymes and proteins*. *Curr Opin Rheumatol*, 1992. **4**(6): p. 815-20.
269. Waterman-Storer, C.M., *The cytoskeleton of skeletal muscle: is it affected by exercise? A brief review*. *Med Sci Sports Exerc*, 1991. **23**(11): p. 1240-9.
270. Rajappa, M. and A. Sharma, *Biomarkers of cardiac injury: an update*. *Angiology*, 2005. **56**(6): p. 677-91.
271. Sorichter, S., B. Puschendorf, and J. Mair, *Skeletal muscle injury induced by eccentric muscle action: muscle proteins as markers of muscle fiber injury*. *Exerc Immunol Rev*, 1999. **5**: p. 5-21.
272. Kusudo, T., et al., *Fatty acid-binding protein 3 stimulates glucose uptake by facilitating AS160 phosphorylation in mouse muscle cells*. *Genes Cells*, 2011. **16**(6): p. 681-91.
273. Sato, Y., et al., *Biochemical markers of myocyte injury in heart failure*. *Heart*, 2004. **90**(10): p. 1110-3.
274. Storch, J. and B. Corsico, *The emerging functions and mechanisms of mammalian fatty acid-binding proteins*. *Annu Rev Nutr*, 2008. **28**: p. 73-95.
275. Brancaccio, P., G. Lippi, and N. Maffulli, *Biochemical markers of muscular damage*. *Clin Chem Lab Med*, 2010. **48**(6): p. 757-67.
276. Kahle, P.J., J. Waak, and T. Gasser, *DJ-1 and prevention of oxidative stress in Parkinson's disease and other age-related disorders*. *Free Radic Biol Med*, 2009. **47**(10): p. 1354-61.
277. Shtifman, A., et al., *Altered Ca²⁺ homeostasis in the skeletal muscle of DJ-1 null mice*. *Neurobiol Aging*, 2011. **32**(1): p. 125-32.
278. Pardo, M., et al., *The characterization of the invasion phenotype of uveal melanoma tumour cells shows the presence of MUC18 and HMG-1 metastasis markers and leads to the identification of DJ-1 as a potential serum biomarker*. *Int J Cancer*, 2006. **119**(5): p. 1014-22.
279. Tsuboi, Y., et al., *DJ-1, a causative gene product of a familial form of Parkinson's disease, is secreted through microdomains*. *FEBS Lett*, 2008. **582**(17): p. 2643-9.
280. Chandran, J.S., et al., *Progressive behavioral deficits in DJ-1-deficient mice are associated with normal nigrostriatal function*. *Neurobiol Dis*, 2008. **29**(3): p. 505-14.

281. Kim, D.H., et al., *Changes in expression of skeletal muscle proteins between obesity-prone and obesity-resistant rats induced by a high-fat diet*. J Proteome Res, 2011. **10**(3): p. 1281-92.
282. Joo, J.I., et al., *Differential expression of adipose tissue proteins between obesity-susceptible and -resistant rats fed a high-fat diet*. Proteomics, 2011. **11**(8): p. 1429-48.
283. Castillo-Quan, J.I., *From white to brown fat through the PGC-1alpha-dependent myokine irisin: implications for diabetes and obesity*. Dis Model Mech, 2012. **5**(3): p. 293-5.
284. Meirhaeghe, A., et al., *Characterization of the human, mouse and rat PGC1 beta (peroxisome-proliferator-activated receptor-gamma co-activator 1 beta) gene in vitro and in vivo*. Biochem J, 2003. **373**(Pt 1): p. 155-65.
285. Stepto, N.K., et al., *Short-term intensified cycle training alters acute and chronic responses of PGC1alpha and Cytochrome C oxidase IV to exercise in human skeletal muscle*. PLoS One, 2012. **7**(12): p. e53080.
286. Sanchez-Muniz, F.J., A. Marcos, and P. Varela, *Serum lipids and apolipoprotein B values, blood pressure and pulse rate in anorexia nervosa*. Eur J Clin Nutr, 1991. **45**(1): p. 33-6.
287. Delporte, M.L., et al., *Hyperadiponectinaemia in anorexia nervosa*. Clin Endocrinol (Oxf), 2003. **58**(1): p. 22-9.
288. McKiernan, S.H., et al., *Cellular adaptation contributes to calorie restriction-induced preservation of skeletal muscle in aged rhesus monkeys*. Exp Gerontol, 2012. **47**(3): p. 229-36.
289. Gerrits, M.F., et al., *Distinct skeletal muscle fiber characteristics and gene expression in diet-sensitive versus diet-resistant obesity*. J Lipid Res, 2010. **51**(8): p. 2394-404.
290. Tian, Q., et al., *Integrated genomic and proteomic analyses of gene expression in Mammalian cells*. Mol Cell Proteomics, 2004. **3**(10): p. 960-9.
291. Cox, B., T. Kislinger, and A. Emili, *Integrating gene and protein expression data: pattern analysis and profile mining*. Methods, 2005. **35**(3): p. 303-14.
292. Spiegelman, B.M., *Banting lecture 2012: regulation of adipogenesis: toward new therapeutics for metabolic disease*. Diabetes, 2013. **62**(6): p. 1774-82.
293. Crujeiras, A., et al., *Body size and adiposity determine human irisin plasma levels*. JCEM, 2013.
294. Takaya, K., et al., *Molecular cloning of rat leptin receptor isoform complementary DNAs--identification of a missense mutation in Zucker fatty (fa/fa) rats*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. **225**(1): p. 75-83.
295. Wolsk, E., et al., *Human skeletal muscle releases leptin in vivo*. Cytokine, 2012. **60**(3): p. 667-73.
296. Savage, D.B., K.F. Petersen, and G.I. Shulman, *Disordered lipid metabolism and the pathogenesis of insulin resistance*. Physiol Rev, 2007. **87**(2): p. 507-20.
297. Delarue, J. and C. Magnan, *Free fatty acids and insulin resistance*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2007. **10**(2): p. 142-8.
298. Santosa, S. and M.D. Jensen, *Why are we shaped differently, and why does it matter?* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2008. **295**(3): p. E531-5.
299. Kozak, L.P., R.A. Koza, and R. Anunciado-Koza, *Brown fat thermogenesis and body weight regulation in mice: relevance to humans*. Int J Obes (Lond), 2010. **34** Suppl 1: p. S23-7.

Agradecimientos

Como lamentablemente todo en la vida tiene un final, he llegado a la última sección de esta tesis doctoral, a priori la sección más sencilla de escribir y que más ganas tenía de completar como apoteósico cierre de una etapa de mi vida, sin embargo me encuentro en un callejón sin salida. De una manera opuesta al síndrome de bloqueo del escritor, mi cabeza hierve con la cantidad de nombres que deberían aparecer en esta sección y con las miles de maneras que se me ocurren para poder plasmar, mínimamente, todo ese profundo agradecimiento que se merecen todos ellos por haberme ayudado de una manera u otra a estar plantado delante de la pantalla del ordenador a punto de dar por concluida una de las mejores experiencias que habré vivido en toda mi vida. Estoy bloqueado, sin embargo estoy convencido que todos estos sentimientos que ocupan mi cabeza fluirán a medida que avance este texto, y a pesar de que muchos nombres no podrán aparecer en esta sección, no significará ni mucho menos que me vaya a olvidar nunca de ellos y de la ayuda que me han ofrecido durante estos últimos años.

Miro ahora hacia atrás y me sorprende pensar que han pasado ya 6 años desde aquel día que paseando por la facultad de farmacia por casualidad me encontré con la oferta del grupo de Endocrinología para realizar la tesis doctoral. Han pasado 6 años ya desde aquel momento que entré por primera vez en aquel “extraño” y antiguo laboratorio de la facultad de Medicina, dirigido por el prestigioso profesor Felipe Casanueva (al que nunca podré agradecer lo suficiente el haber confiado en mí como para ofrecerme la oportunidad de trabajar en su equipo y aprender de los mejores). Ahí me encontré por primera vez con algunas de las personas que marcarían para siempre mi vida como estudiante predoctoral. Han pasado 6 años, pero yo aún recuerdo todo como si hubiera ocurrido ayer...

Fue en ese estrecho laboratorio en donde conocí a geniales investigadores principales que me ayudarían muchísimo en el futuro (de las más inimaginables maneras), desde la ayuda que me brindó Yola para aprobar un examen de RMN del postgrado de Biotecnología (de no ser por ella estaría perdido), pasando por esas rutas de señalización celular que “casi” consigo comprender al completo gracias a la enorme experiencia y conocimiento de Jesús (aunque sigo creyendo que cuando tengo una ruta dominada, misteriosamente esta se ramifica más y más). Muy importante sigue siendo la ayuda ofrecida por la magnífica experta en fisiología Sisi, sin la cual las ratas seguirían siendo para mí esos bichos con cola con los que mantener siempre una distancia prudencial. Ayuda complementada de manera impresionante gracias a la presencia de Omar, el cual, siendo sincero, aparte de fisiología me lo enseñó todo en cuestión de vivir un doctorado y prepararme para dar el salto al postdoc; por lo que al verlo ahora abriéndose paso en la investigación española tras su estancia postdoctoral en EUA, genera en mi una mezcla de alegría, admiración y orgullo por haber compartido con él parte de su etapa investigadora.

No olvidaré nunca a muchas de las personas que pasaron por ese “histórico” laboratorio, como a Carlos y a María, los cuales veo desde la distancia haciéndose un nombre en el panorama científico internacional; o a Marcos, el cual se embarcó en el postdoctorado internacional al poco de llegar, pero al que más adelante tendría la oportunidad de conocer mejor. De la que guardaré un gran recuerdo por supuesto será de Uxía, todo un personaje (en el buen sentido de la palabra) que me acompaña desde el principio de esta empresa para completar la tesis doctoral, la persona con más anécdotas de viaje que he conocido nunca, de hecho una de las frases más escuchadas en el laboratorio es “Lo que no le pase a Uxía...”

Pronto nos tocó hacer las “maletas científicas” para mudarnos al Hospital Clínico, unas nuevas instalaciones en las que compartiríamos nuestra experiencia con grupos de investigación de lo más variado, desde Cardiología a Oncología pasando por Reumatología, y en el que por sorpresa me encontré rodeado de antiguos compañeros y amigos de la carrera como Bruno, Toño o María; haciendo si cabe más especial esta etapa.

En estas nuevas instalaciones, que luego se integrarían dentro del Instituto de Investigaciones Sanitarias de Santiago (“el IDIS” a partir de entonces), conocí y todavía sigo conociendo a muchísimas personas nuevas de las cuales no sería justo destacar unas sobre otras, pues considero el IDIS un todo, un ecosistema en el que todos han aportado su granito de arena para que la experiencia investigadora y personal vivida allí se convierta en una huella imborrable en mi memoria durante el resto de mis peripecias vitales. Y no sólo el IDIS me ha aportado esta huella, servicios del hospital, como el de Cirugía General y Digestiva liderado por los doctores Baltar y bahamonde o el servicio de Anatomía Patológica liderado por el doctor García-Caballero, con su impagable ayuda, me han enseñado como se puede establecer una colaboración básica-clínica perfecta.

Fue en este hospital en donde vi crecer al laboratorio de Endocrinología con muchísimas incorporaciones nuevas y la creación de nuevos grupos henchidos de ganas por crear la mejor ciencia posible. Investigadores como Ana, doctorandos como Begoña o Icí y los magníficos técnicos María y Carlos han hecho si cabe más completo y agradable mi paso por este grupo. Es en estos lares en donde hice mis primeros pinitos como “profesor” que trata de conseguir que los recién llegados puedan volar por sí mismos en el mundo de la pipeta y de la poyata, en especial con Lucía, que tras ayudarnos mutuamente (ella a que me formase como “profesor” y yo a que sacara adelante su proyecto fin de máster), la veo ahora despegando para lograr dar forma a su propia tesis doctoral. Ahora mismo hay muchas caras nuevas, demasiadas como para ponerles nombre a todas, sin significar eso que no formen parte de esta aventura personal; pero si tengo que destacar a una sobre las demás, esta sería Cecilia, una técnico de apoyo que más que apoyo me ha aportado la mejor de las ayudas y la más

perfecta de la compañía que alguien puede desear en un laboratorio, el trinomio formado por Omar, Cecilia y yo mismo será algo que difícilmente se podrá repetir en el futuro, algo que atesoro en mi memoria como uno de los mejores periodos de estos últimos años.

Pero no todo aconteció en Santiago, durante mi doctorado tuve la fortuna de recalar en uno de los mejores laboratorios de España y sin duda en uno de los que mejor me lo he pasado, tanto profesional como personalmente. Siendo sincero, el ambiente vivido en Córdoba fue algo inmejorable, un lugar en el que abundaba el compañerismo, el “buenrollismo” y las bromas; a la par que la mejor ciencia y la mayor exigencia como investigadores. Allí he conocido a personajes irrepitibles como la gran profesora Malagón, que me acogió en su grupo como si fuera uno más y con la que cada vez que conversaba, sin importar el tema, yo sentía que había aprendido una cosa nueva. O Rocío, que tratando de poner a punto la técnica de DIGE confió en mí ayuda a la vez que yo aprendía de su experiencia. Me gustaría destacar también a Marina, que sin duda fue la persona que más me facilitó la estancia en Córdoba con su apoyo y su riquísima comida. En ese laboratorio he conocido tanta gente buena que me apena no poder dedicarles un párrafo a cada uno de ellos, sin embargo estoy convencido que la experiencia cordobesa me seguirá allá a donde vaya en el futuro.

Deliberadamente dejo para el final a las dos personas que más han contribuido a que esta tesis se haya completado y que más han influido en mi etapa profesional. La primera de ellas es Jana, la gran compañera proteómica de la que tanto he aprendido en relación con esta técnica (así como en organización). Una persona que me ha enseñado desde a llevar la mayor pulcritud y exactitud posible en el trabajo con proteínas para obtener las identificaciones más exactas a incluso poder manejar y entender un espectrómetro de masas y el complejo software que le acompaña. Pero no sólo profesionalmente me ha ayudado, Jana ha sido siempre un apoyo personal en esta etapa, e incluso ahora desde la lejana Escocia, sigue colaborando conmigo para dar forma a esta tesis con sus consejos y correcciones.

Sin duda, la última y más importante de las personas que me han ayudado en todos estos años ha sido María Pardo, mi jefa y directora de tesis, pero también amiga y compañera de laboratorio. Una persona que durante los primeros años compartió poyata a mi lado pipeta en mano, para enseñarme desde las técnicas más básicas a las más complejas, a la vez que yo iba descubriendo la ciencia desde su perspectiva personal llenándome la cabeza de ilusiones de futuro y de ganas por ahondar en la investigación con el fin de lograr los más asombrosos resultados. Una persona que fue capaz de generar en mí el deseo de querer convertirme en el mejor investigador que fuese capaz, sin importar el esfuerzo requerido. Una persona que me permitió entender todos los pasos por los que debe pasar un investigador principal para afianzar su carrera y su vida, desde la obtención de sus primeros proyectos de

investigación al establecimiento de su propio grupo emergente, pasando por temas más personales como la compaginación del trabajo y la familia; aprendiendo a cada paso lo que me espera en el futuro si quiero dedicar mi vida a la ciencia y con la certeza de que todo objetivo es posible si uno tiene la decisión firme de llevarlo a cabo. Podría llenar páginas y más páginas sobre lo que supone para mí haber tenido una directora de tesis como María Pardo y lo agradecido que le estaré siempre, pero creo que la mejor forma de poder agradecer todo lo que ha hecho por mí será hacer la mejor ciencia posible en mis siguientes etapas, pues todo lo que logre a partir de ahora habrá sido gracias a su influencia.

Hasta aquí la parte más “profesional” de este capítulo, sin embargo una tesis no se genera tan sólo con las experiencias y ayudas provenientes de un laboratorio, existen multitud de personas ajenas al mundo de la investigación sin las cuales yo no podría haber conseguido llegar hasta aquí. Desde las aventuras vividas junto a los “pitxeiros”, donde cada viaje a Pontevedra se convierte en una aventura y cada fiesta de peñas en un “reunión familiar”; a los necesarios momentos de desconexión que supone acercarse a mi amado Ribadeo, el único lugar del mundo que siempre consideraré como mi único y verdadero hogar; en donde tan buenos amigos me esperan siempre para compartir Xiras, fines de año, noches interminables o los “road trips” a Lóngara.

Mi familia ha sido siempre mi gran apoyo vital a partir del cual conseguir todo lo que me proponía, sin su ayuda no sólo no me habría convertido en investigador, sino que incluso no habría terminado la carrera. Durante mi vida he pasado por momentos muy buenos, pero también muy malos, y en todos ellos han estado ahí apoyándome absolutamente en todo. Tanto a mis padres, que tanta paciencia y esfuerzo han demostrado conmigo, como a mi hermana, toda una artista que incluso ha sacado tiempo para diseñar la portada de esta tesis; no les voy a dedicar esta tesis, puesto que es demasiado pequeña comparada con todo lo que me han ofrecido y me ofrecerán en el futuro; lo mínimo que puedo hacer para agradecerles todo lo que han hecho por mí es dedicándoles toda mi vida, aún a sabiendas de que toda una vida todavía no es suficiente agradecimiento por todo lo que significan para mí.

Si por algo se ha caracterizado esta etapa predoctoral ha sido por la sucesión de momentos buenos y malos, fruto de las complicaciones inherentes a un trabajo de investigación y al estrés de escribir una tesis, malos momentos que me afectaron también anímicamente a nivel personal influyendo en cierta medida en las personas que me rodearon. En esta etapa tuve la grandísima suerte de encontrarme con Morena, una persona capaz de ayudarme a afrontar esos momentos, en especial durante los últimos meses (durante los que sufrí el llamado “estado pretésico”), impidiendo que me dejase llevar por ellos; una persona que quiero muchísimo y

agradezco profundamente que esté a mi lado independientemente de todo lo que pase, ofreciéndome su cariño y comprensión en todo momento.

A todos los que habéis formado parte de mi vida de una forma o de otra en estos 6 últimos años, independientemente de que aparezcáis aquí nombrados o no:

Muchísimas gracias!