



**Universitat de les  
Illes Balears**  
Facultat de Ciències

*Memòria del Treball de Fi de Grau*

# *Mioquines relacionades amb la marronització del teixit adipós blanc: biologia i control per nutrients específics*

*Maria Guijarro Ferrer*

*Grau de bioquímica*

*Any acadèmic 2014-15*

*DNI de l'alumne: 43214237C*

*Treball tutelat per M. Luisa Bonet Piña  
Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut*

*No autoritzo la Universitat a incloure el meu treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línea, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació*

*Paraules clau del treball:*

*Mioquines, marronització, teixit adipós blanc, nutrients, àcids grassos, àcid oleic, àcid 2hidroxioleic, hidroxitirosol, àcid palmític*



<b>ABREVIATURES</b> .....	<b>4</b>
<b>RESUM / ABSTRACT</b> .....	<b>4</b>
<b>1. REVISIÓ BIBLIOGRÀFICA</b> .....	<b>5</b>
1.1. PROCÉS DE MARRONITZACIÓ DEL GREIX BLANC.....	6
1.1.1. Tipus de cèl·lules adiposes .....	6
1.1.2. Estímul i reguladors centrals del procés de marronització.....	8
1.2. MIOQUINES RELACIONADES AMB EL PROCÉS DE MARRONITZACIÓ.....	10
1.2.1. El múscul esquelètic com a òrgan secretor .....	10
1.2.2. Mioquines destacades en relació amb el procés de marronització .....	11
Miostatina .....	11
Irisina .....	11
IL-6 .....	12
Fgf21 .....	14
Apelina .....	15
IL-15 .....	15
Baiba .....	16
1.3. NUTRIENTS O COMPOSTS BIOACTIUS DELS ALIMENTS AMB EVIDÈNCIA DE LA SEVA CAPACITAT DE PROMOURE LA MARRONITZACIÓ DEL TEIXIT ADIPÓS .....	16
Fucoxantina.....	16
Resveratrol.....	17
Àcid linoleic conjugat.....	17
Àcids grassos i altres composts presents a l'oli d'oliva .....	18
<b>2. APARTAT EXPERIMENTAL</b> .....	<b>19</b>
2.1. HIPÒTESI I OBJECTIUS .....	19
2.2. MATERIALS I MÈTODES .....	19
Línia cel·lular, medis, condicions de cultiu i diferenciació .....	19
Tractament .....	20
Extracció ARN.....	20
Anàlisi de l'expressió de l'ARNm mitjançant RT-qPCR.....	21
Mesura dels nivells de IL-6 en el medi de cultiu mitjançant la tècnica ELISA .....	21
Anàlisi estadístic .....	21
2.3. RESULTATS .....	22
2.4. DISCUSSIÓ.....	25
<b>3. CONCLUSIONS</b> .....	<b>28</b>
<b>4. BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>29</b>
<b>ANNEXOS</b> .....	<b>31</b>

## ABREVIATURES

<b>ALC</b>	àcid linoleic conjugat	<b>2OHOA</b>	àcid 2 hidroxioleic (de l'anglès 2-hydroxyoleic acid)
<b>CAC</b>	caquèxia associada a càncer	<b>PA</b>	àcid palmític (de l'anglès palmitic acid)
<b>C/EBP<math>\alpha</math></b>	(de l'anglès CCAAT/enhancer-binding protein $\alpha$ )	<b>PGC-1<math>\alpha</math></b>	(de l'anglès PPAR $\gamma$ coactivator-1 $\alpha$ )
<b>CtBP1/2</b>	(de l'anglès C-terminal-binding protein 1/2)	<b>PPAR<math>\gamma</math></b>	(de l'anglès peroxisome proliferator-activated receptor gamma)
<b>EBF2</b>	(de l'anglès early B cell factor-2)	<b>pRB</b>	proteïna del retinoblastoma (de l'anglès retinoblastoma protein)
<b>Fgf21</b>	(de l'anglès fibroblast growth factor-21)	<b>PRDM16</b>	(de l'anglès PR domain containing 16)
<b>Fndc5</b>	(de l'anglès encoding fibronectin type III domain containing 5)	<b>SIRT1</b>	(de l'anglès sirtuin 1)
<b>HT</b>	hidroxitirosol (de l'anglès hydroxytyrosol)	<b>TA</b>	termogènesi adaptativa
<b>IL-6</b>	interleuquina-6	<b>TAB / WAT</b>	teixit adipós blanc / white adipose tissue
<b>ME</b>	múscul esquelètic	<b>TAM / BAT</b>	teixit adipós marró / brown adipose tissue
<b>Mstn</b>	miostatina	<b>TLE3</b>	(de l'anglès transducin-like enhancer3)
<b>OA</b>	àcid oleic (de l'anglès oleic acid)	<b>UCP1</b>	(de l'anglès uncoupling protein 1)

## RESUM / ABSTRACT

**Antecedents:** El múscul esquelètic és una font de proteïnes senyalitzadores, mioquines. El procés de marronització del teixit adipós blanc consisteix en l'adquisició de característiques pròpies dels adipòcits marrons. La modulació per components alimentaris de la secreció de mioquines relacionades amb el procés de marronització és d'interès en el camp de la nutrició molecular i l'alimentació funcional pel control de l'obesitat i les seves seqüeles metabòliques. L'àcid oleic i polifenols de l'oli d'oliva pareixen exercir efectes beneficiosos en el metabolisme.

**Objectius:** a) Dur a terme un treball bibliogràfic sobre els esmentats antecedents; b) investigar possibles efectes directes diferencials de l'àcid oleic (OA), l'àcid 2 hidroxioleic (2OHOA), l'hidroxitirosol (HT, un polifenol present a l'oli d'oliva verge) i l'àcid palmític (PA) sobre l'expressió de mioquines que han estat relacionades amb el procés de marronització.

**Mètodes:** Cèl·lules C2C12 diferenciades en miotubs varen ser tractades amb el vehicle (cèl·lules control) o amb els composts problema durant 24h. Es va analitzar l'expressió dels gens IL-6, Fgf21, Fndc5 i Pgc-1 $\alpha$  mitjançant l'anàlisi de l'ARNm per una RT-qPCR. També es mirà la proteïna IL-6 acumulada en el medi mitjançant la tècnica ELISA.

**Resultats:** Es va veure un increment en l'expressió del gen de IL-6 en les cèl·lules tractades amb OA (100 $\mu$ M i 250 $\mu$ M) o 2OHOA (50 $\mu$ M). També es va veure un increment en la proteïna IL-6 en el medi de les cèl·lules tractades amb OA (100 $\mu$ M i 250 $\mu$ M). Hi hagué una disminució d'ARNm de Fgf21 als miotubs diferenciats C2C12 tractats amb OA (250 $\mu$ M) i 2OHOA (50 $\mu$ M) i de Fndc5 als tractats amb OA (250 $\mu$ M). Palmític i hidroxitirosol no tingueren cap efecte significatiu sobre els paràmetres estudiats.

**Conclusió:** L'OA i 2OHOA tenen efectes directes sobre l'expressió de mioquines que han estat relacionades amb el procés de marronització, suggerint que podrien contribuir a la modulació del 'diàleg' múscul-teixit adipós.

**Background:** Skeletal muscle is a source of signaling proteins, myokines. The browning process of white adipose tissue is the acquisition of brown adipocyte characteristics. Modulation of the secretion of browning related by food components is of interest in the fields of molecular nutrition and “functional foods” to control obesity and its metabolic complications. Oleic acid and polyphenols in olive oil appear to exert beneficial effects on metabolism.

**Objectives:** a) To compose a bibliographic search on these background topics; b) To investigate possible differential direct effects of oleic acid (OA), 2 hydroxyoleic acid (2OHOA), hydroxytyrosol (HT, a polyphenol present in olive oil) and palmitic acid (PA) on the expression of selected myokines, which have been related to the process of browning.

**Methods:** C2C12 cells differentiated in myotubes were treated with the vehicle solution (control cells) or with the experimental compounds during 24h. mRNA expression on Il-6, Fgf21, Fdnc5 and Pgc-1 $\alpha$  genes was measured using RTqPCR and the amount of accumulated IL-6 protein in the medium using ELISA technique.

**Results:** Gene expression of Il-6 was induced in the cells treated with OA (100 $\mu$ M and 250 $\mu$ M) or 2OHOA (50 $\mu$ M). An increase in the protein IL-6 accumulated in the medium of cells treated with OA (100 $\mu$ M and 250 $\mu$ M) was also observed. Gene expression of Fgf21 was decreased in the cells treated with OA (250 $\mu$ M) or 2OHOA (50 $\mu$ M), and that of Fdnc5 decreased in the cells treated with OA (250 $\mu$ M). PA and HT did not affect studied parameters.

**Conclusion:** OA and 2OHOA have direct effects on the expression of myokines that have been related to the browning process, suggesting that these compounds may contribute to modulate the crosstalk between muscle and adipose tissue.

## 1. REVISIÓ BIBLIOGRÀFICA

L'obesitat és el major problema nutricional i un dels problemes de salut més importants en les societats desenvolupades. La vida sedentària i el consum de menjar amb alt contingut calòric ha precipitat el seu increment en el món desenvolupat (revisat a (Rv.[1])). Les malalties associades amb l'obesitat, incloent diabetis tipus 2, malalties del cor, resistència a la insulina, hipertrigliceridèmia, dislipèmia, hipertensió i diversos tipus de càncer, entre altres (Rv.[2])). Les estratègies i tractaments per controlar l'obesitat han estat ineficients fins ara a causa de que pensam en l'obesitat com a condició única i no veim que l'etiologia pot ser molt diversa (Rv.[1]). Per poder prevenir-la i/o combatre-la primer de tot hem d'entendre els seus determinants: els mecanismes que té el cervell per manejar la ingesta, el control biològic de l'activitat física, el possible paper que tenen components dels aliments concrets i la importància de la nutrició i l'ambient en els primers anys de vida (Rv.[1]).

Entre els processos relacionats amb l'obesitat que poden suposar noves dianes terapèutiques, s'investiga activament en l'activació del teixit adipós marró i, més recentment, en la marronització del teixit adipós blanc (TAB) (Rv.[1], [3]). En aquest treball ens hem centrat

en aquest darrer procés i, en particular, en el seu possible control per senyals derivades del múscul esquelètic (mioquines).

## 1.1. PROCÉS DE MARRONITZACIÓ DEL GREIX BLANC

### 1.1.1. Tipus de cèl·lules adiposes

En mamífers, el greix es classifica típicament per la seva aparença morfològica. Trobam el teixit adipós blanc (TAB) i el teixit adipós marró (TAM) (Rv.[2]–[4]).

El TAB és el lloc principal de reserva energètica, es troba majoritàriament compost per adipòcits blancs amb forma rodona i de gran diàmetre que contenen gotes lipídiques grans uniloculars i poques mitocòndries (Rv.[2], [4]). Primàriament actuen com a reserva dels triglicèrids neutres, emmagatzemant l'excés calòric per ser usat en temps d'escassetat. A més, tenen funció endocrina, incloent la secreció d'adipoquines (Rv.[4]).

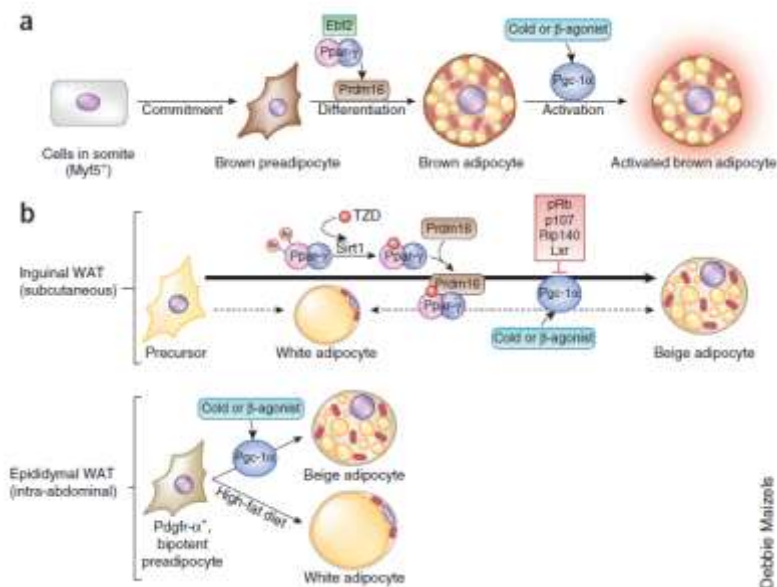
Els adipòcits marrons són normalment més petits, multiloculars amb múltiples gotetes lipídiques petites, molt rics en mitocòndries (Rv.[2], [4]) i resideixen en depòsits que es troben altament innervats i vascularitzats. Aquests depòsits són sovint anomenats TAM 'clàssic' per distingir-lo de les cèl·lules 'brite' (explicades més endavant), residents en alguns TABs (Rv.[2]). El TAM es forma durant el desenvolupament embrionari abans d'altres depòsits (Rv.[3]). Les cèl·lules precursors expressen la firma genètica del múscul Myf5<sup>+</sup>, com s'il·lustra a la **Figura 1a** (Rv.[3], [5]).

Els adipòcits marrons s'especialitzen en la despesa d'energia per generar calor en un procés anomenat termogènesi adaptativa (TA) (Rv.[2], [4]) no causada per el tremolor (Rv.[3], [4]). Aquesta TA es troba mediada per la proteïna desacobladora UCP1 (de l'anglès *uncoupling protein 1*), situada en la membrana mitocondrial interna.

Actua curtcircuitant el gradient electroquímico protònic per l'espai intermembrana, dissipant-lo i produint calor sense generar ATP (Rv.[2]–[5]).

Es pensava que només els rosegadors i els humans recent nats posseïen depòsits de TAM. En canvi, estudis recents han demostrat, mitjançant la tomografia d'emissió de positrons (PET, de l'anglès *positron emission tomography*), que es troben també en humans adults (Rv.[2], [4], [5]). Controlar de manera terapèutica el creixement i/o la despesa energètica del TAM podria ser una estratègia per combatre l'obesitat (Rv.[2]). S'estima que inclús quantitats petites de

TAM podrien conduir a un increment significatiu de la despesa energètica basal conduint a una promoció de la pèrdua de pes (Rv.[4]).



**Figura 1.** Imatge-esquema dels reguladors del teixit adipós i el procés de marronització. Es veu l'origen dels diferents tipus d'adipòcits (incloent les dues hipòtesis de l'origen dels adipòcits beix), els diferents estímuls que indueixen la termogènesi de TAM i el procés de marronització de TAB, així com els factors de transcripció, activadors i repressors que hi participen. Extreta de (Harms & Seale 2013) [3].

A més dels dos teixits comentats fins ara, s'està incrementant l'interès per una tercera classe d'adipòcits anomenats 'brite' (brown in white), també coneguts com: 'beix', 'marró induïble' (TAMi), 'TAM adipós blanc' (TAMb) 'marró reclutable' o 'cèl·lules tipus adipòcits marrons' (Rv.[2]–[5]). Aquest tipus misteriosos d'adipòcits son morfològicament indistingibles dels seus adipòcits blancs veïnats en un estat basal. Quan hi ha una estimulació mitjançant una exposició crònica al fred (o altres mecanismes que mimetitzen l'estimulació  $\beta$  adrenèrgica) es tornen multiloculars, comencen a expressar UCP1 i augmenten el seu contingut en mitocondries (Rv.[2]–[6]). Això és el que s'anomena **procés de marronització**, la capacitat de que els adipòcits blancs adquireixin característiques d'adipòcits marrons (Rv.[5], [6]).

Es debat l'origen dels adipòcits 'brite'. Dins aquesta controvèrsia podem trobar dues teories, una que diu que es transdiferencien (conversió de un tipus cel·lular somàtic diferenciat en un altre sense passar per un estat indiferenciat) d'adipòcits blancs existents o una altra que planteja la possibilitat de que es formin d'un preadipòcit de llinatge únic, *de novo* (Rv.[2], [4]–[6]).

La qüestió menys resolta és si els adipòcits 'brite' contribueixen de manera significativa a la termogènesi. S'ha vist que tenen una major expressió d'ARNm UCP1 però l'expressió total segueix un ordre de magnitud per davall del detectat en el TAM. De fet, la capacitat termogènica màxima que s'ha estimat en el greix 'brite' de ratolins és només un ~10% del greix marró clàssic (Rv.[2]).

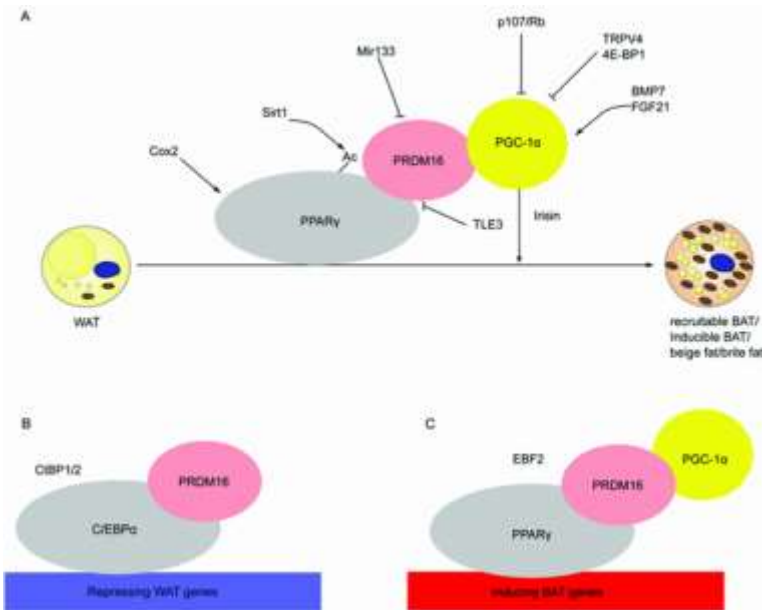
### 1.1.2. Estímuls i reguladors centrals del procés de marronització

Com ja s'ha comentat, baix diversos estímuls certs depòsits de TAB poden prendre un fenotip de TAM donant lloc al procés de marronització del TAB. Estímuls fisiològics, com exposició crònica al fred, hormones, tractament farmacològic (com PPAR $\gamma$ ),  $\beta$  adrenèrgics o agonistes o també nutrients i components alimentaris (vegeu apartat 1.3.), condueixen a un programa d'expressió gènica tipus greix marró (Rv.[5], [6]). En general, els estudis amb animals mostren que la majoria dels estímuls que estimulen l'activitat termogènica del TAM també indueixen la marronització del TAB; per tant, operaran mecanismes reguladors similars (Rv.[5]).

El procés de marronització és complex, involucra com a mínim diversos factors de transcripció, activadors i repressors. A més, s'ha vist que certs depòsits de TAB són menys propensos a sofrir la marronització. Per exemple, TAB visceral/epididimial és menys susceptible a la marronització comparat amb el TAB inguinal/subcutani. Podem trobar tres reguladors centrals del procés de marronització interrelacionats (Rv.[6]) (**Figura 2A**): PPAR $\gamma$  (de l'anglès *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*), PRDM16 (de l'anglès *PR domain containing 16*) i PGC-1 $\alpha$  (de l'anglès *PPAR $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$* ).

**PPAR $\gamma$**  és un factor de transcripció (FT) indispensable per a la diferenciació i la supervivència tant dels adipòcits blancs com marrons. L'activació farmacològica d'aquest FT indueix l'adipogènesi marró a partir de preadipòcits aïllats de TAB. Aquestes cèl·lules incrementen l'expressió no només de UCP1 sinó també d'altres gens relacionats amb la biogènesi i funció mitocondrial (Rv.[6]). PPAR $\gamma$  es troba subjecte a diverses modificacions postraduccionals i funciona en tàndem amb altres reguladors transcripcionals (**Figura 2A**). Entre aquests reguladors, podem trobar **PRDM16**, un altre factor determinant, requerit i suficient per promoure l'adipogènesi marró en TAB (Rv.[7]). Per a que es dugui a terme la interacció entre aquests dos factors és necessària SIRT1 (de l'anglès *sirtuin 1*) que desacetila PPAR $\gamma$  (**Figura 1b**), passa indispensable pel reclutament de PRDM16 al complex transcripcional del PPAR $\gamma$ , conduint al procés de marronització (Rv.[6]).





**Figura 2.** Diferents mediadors exercint el seu efecte en el procés de marronització a través de tres reguladors transcripcionals. Imatge extreta de: (Lo & Sun 2013) [6].

Per la seva banda, PRDM16 induïu gens específics TAM mitjançant la seva associació amb coactivadors transcripcionals com **PGC-1α** (**Figura 2C**) (Rv.[6]). PGC-1α es troba controlat a nivell transcripcional; els agents o les condicions que promouen la transcripció i l'activitat de PGC-1α evoquen aspectes essencials en la marronització (Rv.[5]). PGC-1α és necessari per la termogènesi en el TAM o adipòcits beix però no per la seva diferenciació (Rv.[6]).

Altres molècules actuen damunt aquests tres reguladors claus. Unes afavorint el procés de marronització, i altres inhibint-lo (Rv.[6]). Perquè es doni el procés de marronització, s'ha d'induir l'expressió de gens TAM, però alhora reprimir l'expressió de gens TAB. **EBF2** (de l'anglès *early B cell factor-2*) és un cofactor que regula l'activitat de unió de PPARγ, afavorint la seva unió als promotors dels gens TAM (**Figura 2C**). Altres proteïnes com CtBP1/2 i C/EBPα actuen com a repressores de la transcripció de gens TAB, via PRDM16 (**Figura 2B**). Tant EBF2 com les proteïnes CtBP1/2 i C/EBPα promourien la marronització (Rv.[6]).

**TLE3** actua com inhibidor de la marronització. És un cofactor selectiu del greix blanc (**Figura 2A**) que promou l'emmagatzematge lipídic bloquejant la interacció de PRDM16 amb PPARγ. La inhibició de la marronització també es pot dur a terme bloquejant PGC-1α mitjançant diverses vies (**Figura 2A**) (Rv.[6]).

## 1.2. MIOQUINES RELACIONADES AMB EL PROCÉS DE MARRONITZACIÓ

### 1.2.1. El múscul esquelètic com a òrgan secretor

El múscul esquelètic (ME) és un òrgan rellevant en la regulació de l'homeòstasi energètica. És el principal lloc d'oxidació d'àcids grassos i glucosa i, a més, té una alta capacitat d'ajustar la selecció del combustible depenent del subministre energètic i la demanda [8]. El ME representa un 40% del pes total en homes no obesos i una mica menys en dones no obeses. Per tant, en condicions de no obesitat és el teixit més extens (Rv.[9], [10]).

El teixit muscular es troba majoritàriament compost per miòcits multinuclears, que també s'anomenen miofibrils o fibres musculars. Són cèl·lules molt llargues que contenen les proteïnes contràctils i que duen a terme el treball mecànic. També trobam les cèl·lules satèl·lit localitzades baix la làmina d'aquests miofibrils; aquestes són senescentes i poden ser activades promovent el creixement muscular, el manteniment, la reparació, la regeneració i també poden formar miofibrils multinuclears nous (Rv.[9]).

El paper del teixit adipós com teixit endocrí està clar, però durant els darrers anys molts treballs estan demostrant que el ME també actua com un òrgan endocrí actiu (revisat a [11]). Per ara s'ha vist que produeix cents de factors de secreció (Rv.[10]). No obstant, fins el 2003 no es va introduir el concepte de **mioquina**, entenent-se com a citoquines i altres pèptids produïts, expressats i alliberats per les fibres musculars exercint efectes endocrins [12]. Els primers informes damunt les proteïnes secretores es referien a la miostatina [13] i la interleuquina IL-6 [14].

Per poder incloure's en el grup de mioquines, han de ser secretades pels miòcits més que pels altres tipus cel·lulars del múscul esquelètic. Diverses mioquines són considerades també adipoquines, essent molècules que es secreten en ambdós òrgans i per tant, anomenades adipo-mioquines (Rv.[15]).

Les mioquines poden ser alliberades baix condicions fisiològiques, essent essencials per adaptar-se a diverses situacions fisiològiques i patològiques (Rv.[9]). Poden actuar de diverses maneres: de forma autocrina, paracrina o endocrina; per tant, actuant al propi múscul o damunt teixits distants com el teixit adipós (Rv.[9]–[11], [15]). En concret, la contracció del múscul esquelètic regula la seva expressió i alliberació (Rv.[11], [15]). L'exercici

indueix una remodelació en el múscul esquelètic activant una sèrie de senyals i circuits transcripcionals (exemples: PGC-1 $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , SIRT1 i AMPK).

Sembla que determinades mioquines juguen un paper essencial en el 'diàleg' bidireccional múscul-teixit adipós (Rv.[10]), amb importants implicacions per processos com el control de la lipòlisi i la sensibilitat a la insulina (Rv.[9]), i també el procés de marronització del TAB (vegeu apartat 1.1.) De fet, la sobreexpressió de PGC-1 $\alpha$  al múscul incrementa l'expressió de l'ARNm UCP1, de proteïnes de la cadena respiratòria i d'enzims que oxiden els àcids grassos en el TAB subcutani. Aquests efectes de marronització en el TAB foren en part atribuïts a la secreció de mioquines per part del múscul (Rv.[6]) (vegeu apartat 1.2.2.).

### **1.2.2. Mioquines destacades en relació amb el procés de marronització**

---

A continuació es presenten les mioquines que han estat relacionades amb el procés de marronització.

#### **Miostatina**

---

La miostatina (Mstn), també anomenada GDF8, és el primer factor secretat pel múscul que reuneix els criteris per ser englobat en el concepte de mioquina (Rv.[16]). És membre de la superfamília TGF- $\beta$  i la seva inactivació mitjançant *knockout* (Mstn<sup>-/-</sup>) resulta en una hipertrofia muscular tant en rates com humans (Rv.[10]). En un estudi [17] es veié que el teixit adipós dels ratolins Mstn<sup>-/-</sup> desenvolupen característiques de TAM amb un increment dramàtic de gens característics; incloent Ucp1, Pgc-1 $\alpha$ , Prdm16, Cidea i marcadors d'adipòcits beix. Això ho fa regulant els adipòcits madurs, no en preadipòcits. En el mateix experiment [17] confirmaren la seva hipòtesi: la inducció de la marronització d'aquests ratolins *knockout* és mitjançant l'increment dels nivells de Fndc5, a través de l'activació de la via AMPK-PGC1 $\alpha$ -Fndc5 [17].

#### **Irisina**

---

La mioquina irisina, identificada per primera vegada per [18] i anomenada així per el Déu grec Iris (revisat a [19]), és una hormona secretada pel múscul esquelètic que s'ha identificat com a un mediador important en la marronització del TAB ([20], Rv.[21]) potenciant l'augment en la despesa energètica a tot el cos [20] i millorant la tolerància a la glucosa en animals obesos (Rv.[22]). La seva secreció és induïda per exercici, de manera que les concentracions circulants de irisina augmenten en ratolins i en humans mitjançant entrenament (Rv.[3]), tant agut com

prolongat (Rv.[7]), encara que hi ha resultats discordants. Experimentalment, la secreció de irisina també augmenta en resposta a una sobreexpressió ectòpica de PGC-1 $\alpha$  al múscul (Rv.[7], [19], [21]), la qual mimetitzava els efectes fisiològics de l'exercici (Rv.[21]). L'hormona induïx l'expressió de gens termogènics en cèl·lules del teixit adipós (Rv.[7]).

En el 2012 (revisat a [23]) es va identificar el gen *Fndc5* (de l'anglès, *encoding fibronectin type III domain containing 5*) també conegut com FRCP2 i Pep (Rv.[7], [19]) com a blanc de Pgc-1 $\alpha$  i precursor de la irisina (Rv.[3], [16]). *Fndc5* codifica per una proteïna de membrana [18] a partir de la qual, mitjançant un procés d'excisió, s'allibera una part extracel·lular que actua com a pèptid senyalitzador, i és aquesta part l'anomenada irisina (Rv.[19], [23], [24]); FNDC5 és la part no secretada [18]. La irisina pot ser detectada tant en mostres de sèrums humans com murins (Rv.[7], [16]). Segons el mecanisme descrit a [19], l'exercici actuaria augmentant PPAR $\gamma$  i PGC-1 $\alpha$ ; aquest darrer estimularia l'expressió de *Fndc5*, la qual seria proteolíticament escindida i alliberada com hormona activa. La irisina té receptors de superfície cel·lulars mitjançant els quals incrementaria l'expressió de l'ARNm UCP1 i Cidea, els quals causarien la marronització del teixit adipós visceral i també subcutani i a més induiria la termogènesi [19].

Un increment modest de la concentració de irisina en el sèrum en els ratolins estimula el desenvolupament del greix beix conduint a potenciar la tolerància a la glucosa i disminuint el guany de pes (Rv.[3]). Encara és necessària la identificació del receptor de la irisina i conèixer les cascades de senyalització (Rv.[25]).

## IL-6

---

La interleuquina-6 (IL-6) és la mioquina més caracteritzada i ben descrita (Rv.[9], [11]). És una citoquina 'promiscua' que té aparentment efectes metabòlics contradictoris; per exemple, l'exercici induïx un increment agut en la producció de IL-6 en el múscul esquelètic, però l'exercici regular s'associa amb nivells reduïts de IL-6 al plasma durant l'estat de descans. A més, els nivells de IL-6 en plasma es troben incrementats en individus obesos i la IL-6 produïda per adipòcits blancs té efectes deleteris en la sensibilitat insulínica hepàtica en ratolins (Rv.[23], [24]). S'ha vist que una elevació crònica de la IL-6 quan és secretada pel teixit adipós i, per tant, com adipoquina, pot induir a la resistència a la insulina per part del múscul (Rv.[15], [24]).

La concentració circulant de la IL-6 augmenta de manera exponencial amb l'exercici (Rv.[11]) i fou així com es va descobrir, ja que es produeix un augment exponencial proporcional a la duració de l'exercici i la quantitat de massa muscular implicada (Rv.[10]). Aquesta mioquina és expressada per diferents tipus cel·lulars; miofibres de rosegadors, cèl·lules mare associades al múscul i tant mioblasts com miotubs humans cultivats (Rv.[10]).

En un principi es creia que l'increment dels nivells de la IL-6 durant l'exercici era conseqüència d'una resposta immune degut al dany local als músculs implicats en l'exercici i, per tant, es pensava que els macròfags eren els responsables d'aquest augment. Actualment ja es parla de una secreció dominant per part del múscul d'aquesta citoquina durant l'exercici. (Rv.[10]).

La IL-6 exerceix efectes localment en el múscul i, quan s'allibera a la circulació, efectes perifèrics en diversos òrgans en una manera tipus hormonal. De manera específica, en el múscul esquelètic, la IL-6 actua de manera autocrina o paracrina resultant en l'activació de AMPK i/o la fosfatidilinositol cinasa 3 (PI3-kinase) per incrementar la captació de glucosa produïda durant l'exercici o la lipòlisi en el teixit adipós [26]. A part d'aquests efectes la IL-6 regula altres processos incloent el desenvolupament del sistema nerviós i hematopoètic, la resposta immune i la inflamació [27], exercint un efecte antiinflamatori [12] estimulant la secreció de citoquines clàssiques antiinflamatòries com la IL-10 i IL-1ra (Rv.[28]).

La IL-6 s'ha relacionat recentment amb la inducció massiva de marronització del TAB a la caquèxia [29]. El síndrome de caquèxia associada a càncer (CAC) es caracteritza per una inflamació sistèmica, pèrdua de pes corporal i atrofia del teixit adipós blanc i múscul esquelètic [29]. S'observa en la majoria de pacients de càncer en fases avançades [30]. S'ha vist com a la caquèxia hi ha un canvi fenotípic de teixit adipós blanc a marró, el procés de marronització [29], que contribueix de manera significativa a la despesa energètica observada en aquest síndrome [31]. Aquesta marronització es du a terme en els processos inicials de la caquèxia, abans de que el múscul esquelètic s'atrofii. En els ratolins caquèxics la inflamació crònica i l'alliberació massiva de IL-6 des del múscul incrementen l'expressió de UCP-1 en el teixit adipós blanc conduint a un increment de la mobilització de lípids i una despesa d'energia [29]. Aquests resultats també ens fan pensar en els perills inherents a una activació descontrolada del procés de marronització, encara que el procés pot tenir característiques particulars al CAC.

## Fgf21

---

FGF21 (de l'anglès fibroblast growth factor-21) és un membre de la superfamília de factors de creixement de fibroblasts (FGF) [20]. Els membres d'aquesta família són majorment secretats com a proteïnes de senyalització amb funcions diverses damunt el desenvolupament i la proliferació/diferenciació cel·lular. FGF21 és l'únic FGF amb activitats metabòliques però no proliferatives (Rv.[32]).

S'ha demostrat que FGF21 actua damunt diferents teixits afectant al seu metabolisme, tant lipídic com de carbohidrats. També potencia la sensibilitat a la insulina, disminuint les concentracions de triacilglicerol i causant pèrdua de pes [20]. Concretament, com a mioquina, FGF21 protegeix de l'obesitat induïda per la dieta i la resistència a la insulina, indueix la marronització del TAB i protegeix de la hipertròfia cardíaca en ratolins (Rv.[32]).

Es sap que és una hormona que s'indueix en el fetge en el dejuni. Un estudi recent ha demostrat que FGF21 indueix l'expressió hepàtica de PGC-1 $\alpha$ , un regulador transcripcional clau en l'homeòstasi energètica, i causa l'increment corresponent en l'oxidació dels àcids grassos, el flux del cicle de l'àcid tricarbòxilic i la gluconeogènesi sense incrementar la glicogenòlisi [26]. Aquests resultats manifesten una relació entre FGF21 i PGC-1 $\alpha$ . Per una altra part, es té constància, que uns nivells circulants de FGF21 crònics causen pèrdua òssia en ratolins, FGF21 derivat del teixit adipós roman local i no contribueix als nivells circulants (Rv.[25]).

Encara que el lloc de major producció és el fetge, usant el model 'myomouse', un ratolí transgènic creat per aquest grup, Walsh i els seus col·laboradors [33] varen identificar que FGF21 és produït pel múscul esquelètic, encara que la funció biològica concreta de la mioquina FGF21 encara no és coneguda [26]. A més, en condicions específiques, com exposició al fred i l'activació del receptor  $\beta$  adrenèrgic, l'expressió de FGF21 decreix al fetge, essent potenciada tant al TAM com al TAB, on actua incrementant l'expressió de UCP1 i la marronització del teixit subcutani (revisat a [24]). Es suggereix el paper fisiològic en el reclutament d'adipòcits beix (Rv.[23]). FGF21 incrementa el procés de marronització estabilitzant la proteïna PGC-1 $\alpha$  sense afectar a l'expressió del seu ARNm (Rv.[23]).

Estudis emergents suggereixen que FGF21 és un mediador per mantenir l'homeòstasi energètica en el cos en condicions d'estrès. L'estrès ambiental, nutricional, mitocondrial i l'exercici indueixen l'expressió de FGF21. Aquest augment de l'expressió es veu incrementada

en múltiples òrgans. Conseqüentment, aquesta elevació induïx diferents efectes metabòlics que ajuden als òrgans més importants a adaptar-se a aquests estímuls (Rv.[34]).

### **Apelina**

---

S'ha vist que l'entrenament augmenta l'expressió en el múscul de l'ARNm apelina en subjectes obesos no diabètics amb un entrenament de 8 setmanes. A més, també és induïda i secretada *in vitro* en miotubs primaris humans i pot, per tant, comportar-se com una mioquina regulada per exercici amb acció autocrina/paracrina [35]. Si indaguem un poc més, veim que un estudi realitzat en abril del 2015 [36] ha revelat els efectes que té aquesta molècula en l'adipogènesi dels adipòcits marrons i en la marronització, concretament incrementant l'expressió de UCP1 i Cox en el teixit adipós blanc tant en adipòcits humans com en adipòcits 3T3-L1 de ratolins. També potencia la respiració mitocondrial, suggerint que aquesta molècula promou que el TAB adquireixi les característiques del TAM [36].

### **IL-15**

---

La interleuquina-15 (IL-15) és una citoquina amb similituds a la IL-2. S'expressa en el ME humà de manera constitutiva i s'influencia la seva expressió mitjançant entrenament ([26], revisat a [9]). A part dels seus efectes anabòlics en el propi teixit, es proposa que pot tenir un paper important en el metabolisme lipídic. Aquesta molècula disminueix la deposició lipídica en els preadipòcits i també disminueix la massa del teixit adipós blanc (Rv.[10]).

Certs estudis estan mirant els efectes de IL-15 en el TAM. Almendro et al. [37] observaren que un tractament a rates amb IL-15 causava una disminució de TAB i TAM i, en aquest darrer, un augment del contingut de proteïnes termogèniques, factors de transcripció relacionats amb el metabolisme lipídic i altres proteïnes implicades en el transport de membrana, transport mitocondrial i consum d'àcids grassos. Van concloure que IL-15 pot trobar-se implicada en el consum de lípids regulant la oxidació lipídica i la termogènesi [37].

Un altre estudi amb cèl·lules musculars diferenciades, també tractades amb IL-15, mostraren un increment de marcadors miogènics i gens expressats a BAT [38].

La relació entre IL-15 i el procés de marronització, en canvi, no es veu tan clar. Un estudi proposa que l'augment de IL-15 promogut per l'exercici físic podria mediar l'expressió

de gens associats a TAM mitjançant la inducció de l'expressió de la mioquina irisina, la qual veieren augmentada significativament [11].

A més, aquesta molècula estimula la secreció d'adiponectina, i els tractaments amb aquesta citoquina milloren la homeòstasi de la glucosa i la sensibilitat a la insulina en ratolins obesos (Rv.[24]). Encara que en moltes revisions destaquen el potencial paper que pot tenir aquesta interleuquina, en molts altres es discuteix, fins i tot, que sigui regulada per contracció ja que hi ha molta literatura que ho contradiu [11].

### **Baiba**

Roberts et al. [39] va identificar BAIBA com a mioquina induïda per contracció que afavoreix la marronització del TAB i incrementa la oxidació de greixos al fetge [40]. El metabòlit àcid  $\beta$ -aminoisobutíric incrementa l'expressió de gens específics de teixit adipós marró en el TAB i la  $\beta$ -oxidació d'àcids grassos en hepatòcits, demostrat tant *in vitro* com *in vivo* a través del mecanisme mediat per PPAR $\alpha$ , indueix el fenotip tipus adipós marró en les cèl·lules mare pluripotents humanes i millora la homeòstasi de la glucosa en ratolins [39].

### **1.3. NUTRIENTS O COMPOSTS BIOACTIUS DELS ALIMENTS AMB EVIDÈNCIA DE LA SEVA CAPACITAT DE PROMOURE LA MARRONITZACIÓ DEL TEIXIT ADIPÓS**

Hi ha tota una sèrie de components alimentaris que han estat relacionats amb el procés de marronització en estudis en adipòcits en cultiu i en animals experimentals (Rv. Bonet et al. [5]). Aquí es presenten alguns dels més significatius:

### **Fucoxantina**

La fucoxantina és un carotenoide al·lènic present en els cloroplasts d'algues marrons comestibles. És el més abundant de tots els carotenoides. La fucoxantina, o extractes d'algues riques en aquest compost, sol o mesclat amb altres agents seleccionats, s'ha vist que contraresta el desenvolupament de l'obesitat dietària i redueix el TAB en animals obesos a través de mecanismes que inclouen l'estimulació de la marronització del TAB, amb la inducció de l'expressió d'UCP1 i els gens relacionats amb el catabolisme dels lípids al TAB abdominal. Addicionalment, hi ha evidència de que l'activació de AMPK pot contribuir en els efectes de la



fucoxantina damunt la estimulació de la  $\beta$ oxidació dels àcids grassos i la reducció de la lipogènesi en el TAB (Rv.[5]).

### **Resveratrol**

---

El resveratrol (3,5,4-trihidroxiestilbè) és un polifenol natural present en el raïm i altres aliments vegetals. Té molts efectes sobre el metabolisme i aspectes relacionats en mamífers. Aquests efectes es creu que són deguts, almenys en part, a la capacitat del resveratrol per activar AMPK, SIRT1 i PGC-1 $\alpha$ . En els ratolins en dieta hipercalòrica, la suplementació amb una alta dosi de resveratrol es va demostrar que protegeix contra el desenvolupament de l'obesitat induïda per la dieta i la resistència a la insulina i per millorar la despesa energètica basal de tot el cos (Rv.[5]).

Hi ha hagut troballes que suggereixen un efecte damunt el procés de marronització. En concret s'ha vist que el resveratrol augmenta el contingut d'ADN mitocondrial i l'oxidació d'àcids grassos juntament amb l'expressió d'UCP1 en els adipòcits derivats de MEF i l'expressió de UCP1 en la maduració de preadipòcits 3T3-L1. D'altra banda, encara no hi ha evidència publicada per un efecte de marronització del resveratrol dietari en el TAB *in vivo* (Rv.[5]).

### **Àcid linoleic conjugat**

---

L'**àcid linoleic conjugat (ALC)** és un grup d'àcids grassos de la dieta amb capacitat per reduir significativament la massa adiposa en varietat d'espècies. Els mecanismes pels quals l'ALC (específicament l'isòmer trans-10, cis-12) redueix la massa adiposa poden incloure una combinació d'apoptosi incrementada, disminució de la diferenciació dels preadipòcits, lipogènesi i un increment d'oxidació d'àcids grassos i despesa d'energia en els adipòcits blancs (Rv.[5]). Un estudi ha demostrat que l'àcid linoleic conjugat és capaç de reduir la massa de greix corporal mitjançant diferents mecanismes, intercedint en la regulació de la ingesta, en la despesa energètica i augmentant l'apoptosi en els adipòcits del teixit adipós blanc (Rv.[5]). En un altre experiment on usaren un àcid linoleic conjugat cis-9, trans-11 es va veure que induïa la potenciació depenent d'insulina del metabolisme tant glucolític com dels àcids grassos. A més, es va veure que era depenent de temps i de dosi en l'expressió de AMPK [8].

Encara que hi ha estudis que reporten que ALC no canvia o inclús disminueix l'expressió de UCP1 en el TAM, hi ha altres estudis independents que suggereixen que el procés de marronització podria trobar-se involucrat en l'efecte antiobesitat d'aquest compost (Rv.[5]).

## Àcids grassos i altres composts presents a l'oli d'oliva

El consum d'oli d'oliva s'ha relacionat amb la salut metabòlica en humans i rosegadors. S'han descrit els efectes estimulants de l'oli d'oliva sobre l'expressió d'UCPs. Les rates alimentades amb una dieta rica en greixos basada en oli d'oliva exhibeixen un increment en el consum d'oxigen corporal total i un increment en l'expressió de tres UCPs en el TAM i de UCP3 en el múscul [41]. De manera similar Priego et al. trobaren un augment dels nivells de UCP1 en el TAM de rates Wistar, descendents de mares suplementades amb oli d'oliva durant la gestació i l'alletament, en comparació amb les descendents de mares suplementades amb margarina o mantega [42]. L'oli d'oliva és una font rica de l'àcid oleic (Rv.[5]).

En un estudi, l'administració oral d'**àcid oleic** (cada 12h durant 7 dies) va reduir lleugerament el pes corporal i la ingesta d'aliments en rates sense afectar l'expressió d'UCP1 a TAM o TAB [43]. El mateix estudi posà de manifest, però, un efecte més fort per part de l'**àcid 2 hidroxioleic** (un derivat sintètic de l'àcid oleic) en la reducció de pes corporal i el greix corporal, que va ser paral·lel a la inducció de l'expressió de UCP1 selectivament en TAB (però no en TAM). En aquest treball, l'àcid 2 hidroxioleic s'ha seleccionat com un dels composts a testar per la seva capacitat, prèviament demostrada, d'incrementar l'expressió d'UCP1 en TAB de les rates tractades [43].

L'**oleuropein** és un compost fenòlic que es troba en l'oli d'oliva verge extra. Els resultats en un estudi suggereixen que aquest compost potencia la termogènesi incrementant el contingut en UCP1 en el TAM i la secreció d'adrenalina i noradrenalina en rates [44]. Un altre article també relacionà *in vivo* i *in situ* l'efecte de l'oli d'oliva verge extra amb l'expressió de UCP1 en el TAM veient que hi havia un increment d'aquesta proteïna termogènica [45].

L'**hidroxitirosol** és un compost fenòlic present en l'oliva, en la fulla i en l'oli d'oliva. Des de fa temps s'estudien els possibles beneficis en la protecció en front a diverses malalties, entre elles s'ha relacionat amb un paper beneficiós davant malalties cardiovasculars, càncer i SIDA [46].

La revisió realitzada ens indica que hi ha tota una sèrie de components d'aliments que han estat relacionats amb la marronització del TAB *in vivo* i també tota una sèrie de mioquines que han estat relacionades amb aquest procés. No obstant, hi ha molt pocs estudis que hagin investigat la modulació de la producció de mioquines en general i en particular de les relacionades amb la marronització del TAB per nutrients/componentes alimentaris. A estudis

previs del LBNB (Laboratori de Biologia Molecular, Nutrició i Biotecnologia de la UIB) s'ha investigat l'impacte de l'àcid oleic (cis) en comparació a l'elaídic (trans) [47] i d'una mescla de oleic i linoleic [48] sobre l'expressió d'algunes mioquines i altres gens a cèl·lules musculars en cultiu.

## **2. APARTAT EXPERIMENTAL**

### **2.1. HIPÒTESI I OBJECTIUS**

**Hipòtesi:** Canvis en la secreció de determinades mioquines podrien contribuir a l'efecte inductor de marronització del TAB d'aliments/componentes alimentaris funcionals amb efectes positius sobre la salut metabòlica, com ara, certs components de l'oli d'oliva.

**Objectius:** 1) Comparar l'activitat de l'àcid oleic (OA) monoinsaturat, majoritari en l'oli d'oliva, el seu anàleg sintètic amb un OH en posició 2, l'àcid 2 hidroxioleic (2OHOA) i l'àcid gras saturat més abundant en la dieta, l'àcid palmític (PA) sobre l'expressió de les mioquines IL-6, FGF21 i Fndc5 comentades abans i el factor PGC-1 $\alpha$  en un model de cèl·lules de múscul esquelètic mitjançant diferents tècniques. 2) Examinar possibles efectes del polifenol hidroxitirosol (HT) present a l'oli d'oliva verge sobre aquests mateixos paràmetres.

### **2.2. MATERIALS I MÈTODES**

#### ***Línia cel·lular, medis, condicions de cultiu i diferenciació***

La línia cel·lular de miòcits C2C12 usada es troba descrita en la **Taula 1** (annex). Les cèl·lules es cultivaren en plaques de 12 pouets (Corning Inc., NY, USA) amb cada pouet de 2 cm<sup>2</sup>. Amb les següents condicions de cultiu: una temperatura de 37°C i una concentració de CO<sub>2</sub> del 5% (aquest percentatge de CO<sub>2</sub> és òptim quan el medi es manté a un pH de 7.4).

Es mantingueren en medi de creixement fins que arribaren a un 80-100% de confluència, com es mostra en el dia 0 de la **Figura 6** (annex). El medi de creixement contenia el següent: 10% p/v de FBS (de l'anglès fetal bovine serum 10270, Gibco, Life technologies), 1% v/v de penicil·lina (Aldrich Co., St Louis, MO, USA) i 1% v/v d'estreptomicina (Aldrich Co., St Louis, MO, USA) en High-glucose DMEM (30-2002<sup>TM</sup>, ATCC<sup>®</sup>).

Una vegada arribaren a la confluència òptima es canvià al medi de diferenciació. Aquest medi conté un 2% p/v de horse serum (16050-122, Gibco, Life technologies), un 1% v/v de penicil·lina i un 1% v/v d'estreptomicina High-glucose DMEM (30-2002™, ATCC®). El segon i tercer dia de diferenciació es va suplementar el medi de diferenciació amb Ara-C ( de l'anglès *Arabinoside C*, C1768-100MG, Sigma) a una concentració de 10µM per eliminar les cèl·lules en divisió. Posteriorment i fins el dia del tractament es va seguir amb el medi de diferenciació fins que els miòcits es fusionaren donant lloc als miotubs, vist amb un examen microscòpic. En la **Figura 6** (annex) podem veure el procés de diferenciació.

### Tractament

Els miotubs diferenciats C2C12 (dia 5) es van tractar amb diferents àcids grassos naturals o sintètics durant 24h. Es van mesurar els nivells de mRNA en les cèl·lules i de proteïna al medi.

L'àcid oleic proporcionat per Aldrich Co. (St Louis, MO, USA) fou dissolt en DMSO com a vehicle i diluït en DMEM. L'àcid 2-hidroxioléic proporcionat per Aldrich Co. (St Louis, MO, USA) va ser dissolt en DMSO com a vehicle i diluït en DMEM. L'hidroxitirosol proporcionat per Aldrich Co. (St Louis, MO, USA) va ser dissolt en aigua com a vehicle i diluït en DMEM. El palmitat proporcionat per Perkin Elmer (NY, USA) va ser dissolt en DMSO com a vehicle i diluït en DMEM. El DMSO mai va superar el 0,1% de concentració final una vegada diluït per evitar el seu possible efecte tòxic. Previ al tractament les cèl·lules es van rentar dues vegades amb PBS i es va afegir 1 ml medi amb el tractament corresponent per pouet. Les mostres foren recol·lectades a les 24h de tractament i immediatament guardades a -80°C. Els tractaments foren els següents:

**Taula 1.** Composts i concentracions usades pel tractament de les cèl·lules C2C12.

(1) vehicle (DMSO)			
(2) àcid oleic (OA)	100µM	250µM	400µM
(3) àcid 2 hidroxioléic (2OHOA)	10µM	50µM	100µM
(4) àcid palmític (PA)	400µM		
(5) vehicle (H2O)			
(6) hidroxitirosol (HT)	25µM	50µM	100µM

### Extracció ARN

L'extracció d'ARN total dels miotubs C2C12 es va realitzar amb el kit E.Z.N.A® Total RNA kit I de la casa comercial OMEGA bio-tek. L'ARN aïllat es va quantificar usant l'espectrofotòmetre NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, Delaware, USA) i la seva

integritat fou confirmada mitjançant una electroforesis en gel d'agarosa (**Figura 6**, annex). Es varen confirmar els ratis A260:A280 per totes les mostres, indicant que la puresa del ARN va ser bona.

### **Anàlisi de l'expressió de l'ARNm mitjançant RT-qPCR**

La retrotranscripció, seguida de una PCR a temps real (quantitativa) es va usar per mesurar els nivells d'expressió d'ARNm Pgc-1 $\alpha$ , Fndc5, Il-6 i Fgf21 en les cèl·lules musculars C2C12. L'ARN total va ser retrotranscrit a ADNc (ADN copia) i es va realitzar la PCR a temps real usant LightCycler System amb una detecció no específica de seqüència SYBR Green (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Germany). Els encebadors es troben descrits a la **taula 2** (annex) produïts per Sigma (Madrid, Spain).

Es va pipetejar 5 $\mu$ L del volum total, contenint 0,20  $\mu$ L d'ARN total i es va desnaturalitzar la mostra 10 minuts a 65 $^{\circ}$ C. Es va fer la transcripció reversa a ADNc usant una transcriptasa reversa MuLV (Applied Biosystems, Madrid, Spain) Posteriorment se li va afegir 7.5  $\mu$ L de la master mix. Condicions de la transcripció reversa: 15 minuts a 20 $^{\circ}$ C, 30 minuts a 42 $^{\circ}$ C i finalment 5 minuts a 95 $^{\circ}$ C. Mantenint a continuació la mostra a 4 $^{\circ}$ C.

Les reaccions PCR (saiki et al. 1988) es van dur a terme per amplificar fragments específics d'ADNc. Cada PCR va ser duta a terme amb l'ADNc, els primers forward i reverse (250nM) i Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Madrid, Spain) a un sistema PCR a temps real StepOnePlus<sup>TM</sup> (Applied Biosystems). Les condicions foren les següents: Desnaturalització inicial: 95 $^{\circ}$ C 10 minuts; es va seguir amb 30 cicles: 95 $^{\circ}$ C 15segons i 60 $^{\circ}$ C 1 minut; finalment es va realitzar la Melt Curve: 95 $^{\circ}$ C 15 segons, 60 $^{\circ}$ C 1 minut i 95 $^{\circ}$ C 15 segons. L'expressió relativa de cada ARNm va ser calculada d'acord amb Pfaffl [49] usant Rplp0 i Ppia com a gens de referència.

### **Mesura dels nivells de IL-6 en el medi de cultiu mitjançant la tècnica ELISA**

La mesura de la IL-6 del medi es va realitzar per un kit ELISA. Quantikine<sup>®</sup> ELISA Mouse IL-6 Immunoassay, un kit de R&D Systems Inc. (Minneapolis, MN, USA).

### **Anàlisi estadístic**

Els resultats estan expressats com la mitjana  $\pm$  la desviació estàndard. Les barres d'error de les gràfiques corresponen a l'error típic. L'expressió de ARNm es refereix al control (grup tractat

amb vehicle). La igualtat dels resultats es van construir a partir d'una **t de Student** de dues coes usant el programa informàtic EXCEL de Microsoft versió 14.0.7147.5001. Les diferències es consideren estadísticament significatives a un valor  $p < 0.05$ .

### 2.3. RESULTATS

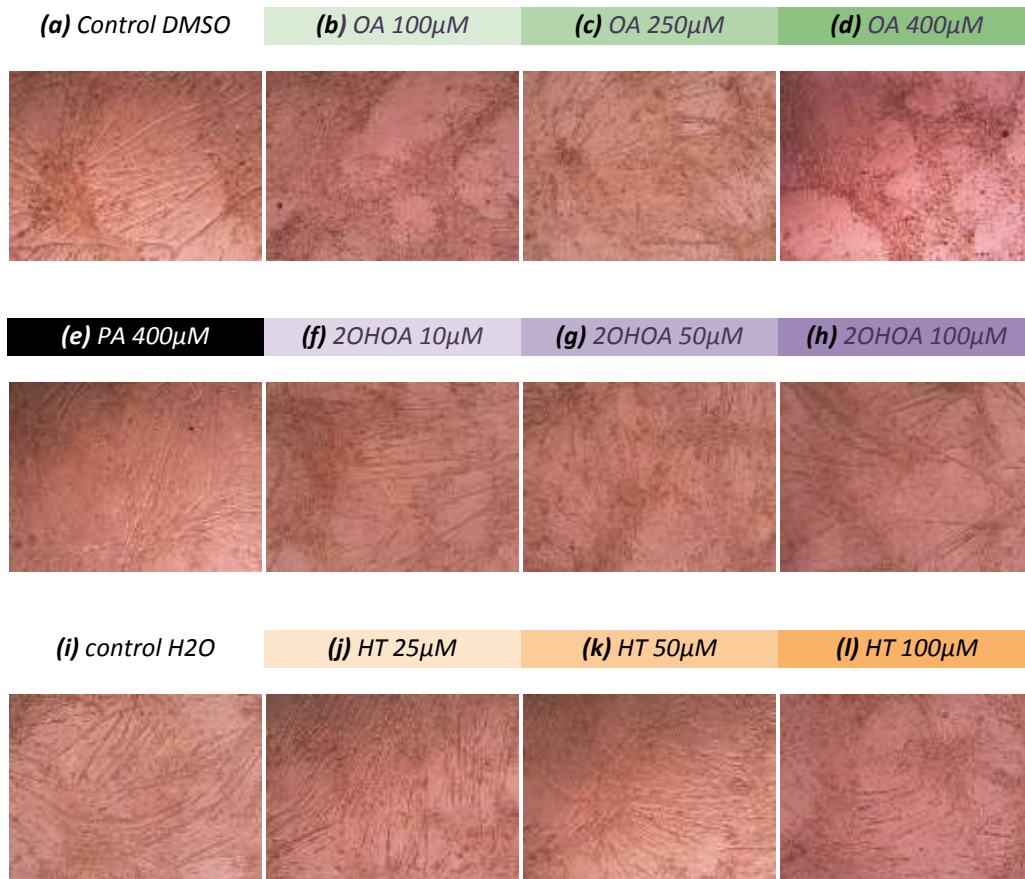
Els miotubs diferenciats varen ser tractats durant 24h amb àcid oleic (100 $\mu$ M i 250  $\mu$ M), àcid palmític (400 $\mu$ M), àcid 2hidroxioleic (10 $\mu$ M, 50 $\mu$ M i 100 $\mu$ M) i hidroxitirosol (25 $\mu$ M, 50 $\mu$ M i 100 $\mu$ M). Es pot observar en la **Figura 3** la forma que tenien els miotubs una vegada havien rebut els respectius tractaments. A la majoria d'imatges veim miotubs ben diferenciats bastant similars al seu respectiu control (vehicle). Hem de destacar que en el cas de OA a concentració de 400 $\mu$ M (**Figura 3d**) es van morir les cèl·lules i per tant ja no férem experiments ni amb les cèl·lules derivades d'aquest, ni amb el seu medi.

Acabat el tractament, es va recollir el medi de cultiu i procedir a l'extracció de l'ARN total de les cèl·lules. Es varen analitzar els canvis d'expressió gènica deguts al tractament dels gens Il-6, Fgf21, Fndc5 i Pgc1 $\alpha$ .

Amb el tractament amb OA es produí un increment significatiu dels nivells d'ARNm d'Il-6 tant a les cèl·lules tractades amb una concentració de 100 $\mu$ M com de 250 $\mu$ M (**Figura 4A**), arribant a ser el doble l'expressió a aquesta darrera concentració respecte de l'expressió als miotubs control. També es va veure una disminució de l'expressió de Fndc5 significativa a una concentració de 250 $\mu$ M OA, i de Fgf21 a la mateixa concentració (**Figura 4A**). La disminució de l'ARNm Fgf21 fou molt pronunciada, menys de la meitat del control. En canvi no es veié cap canvi d'expressió en Pgc-1 $\alpha$  (**Figura 4A**).

Als miotubs diferenciats tractats amb 2OHOA 50 $\mu$ M es veié un increment significatiu dels nivells d'ARNm d'Il-6 i una disminució significativa en l'expressió de Fgf21.

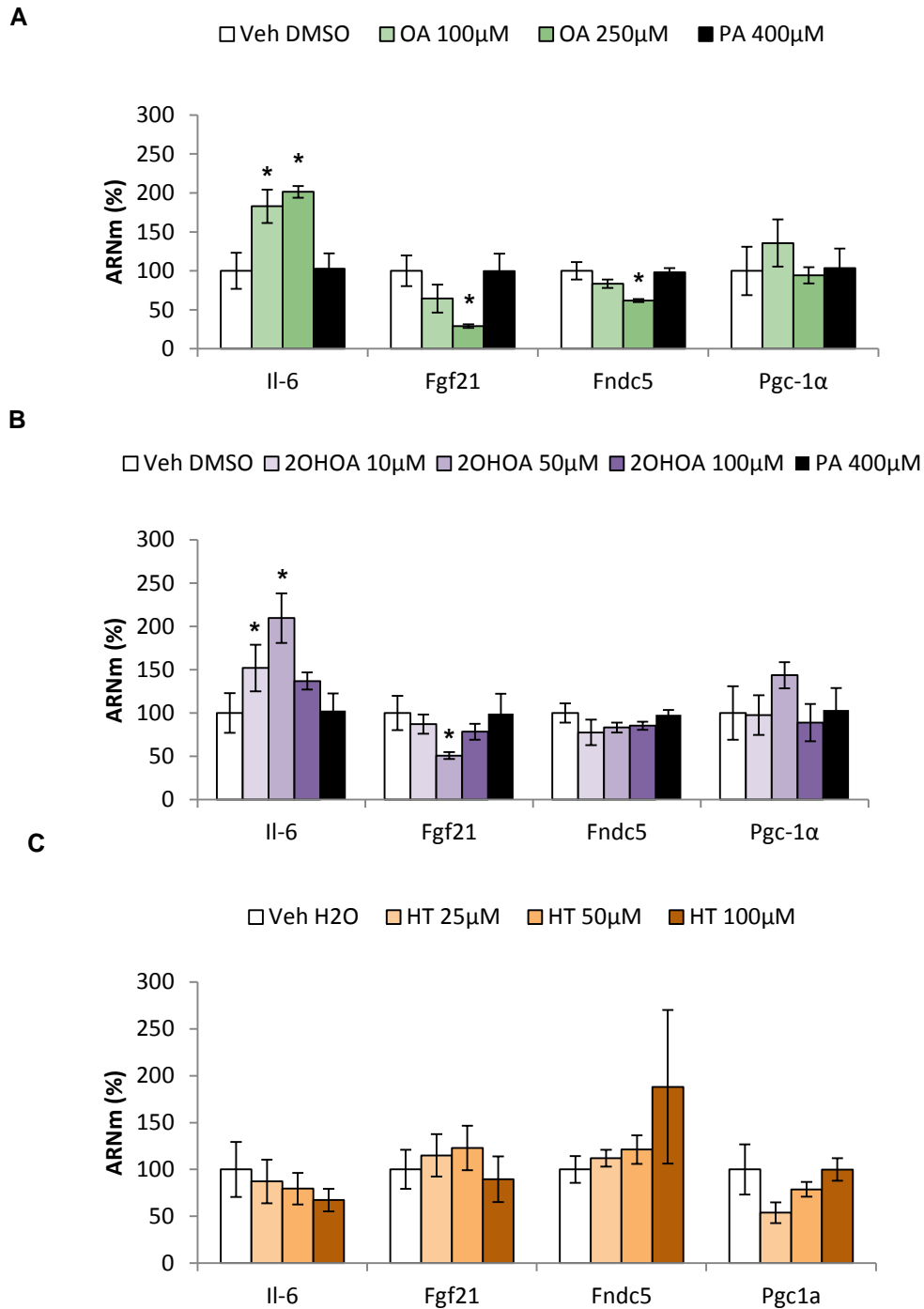
No hi hagué cap augment ni disminució significativa dels nivells d'ARNm amb el tractament amb àcid palmític (**Figura 4A i B**), ni hidroxitirosol (**Figura 4C**).



**Figura 3.** Imatges obtingudes al microscopi òptic a 100 augments dels miotubs C2C12 després del tractament de 24h amb àcid oleic (OA), àcid 2 hidroxioleic (2OHOA), hidroxitirosol(HT) i àcid palmític (PA) a diferents concentracions. Cada tractament es va fer per quadruplicat.

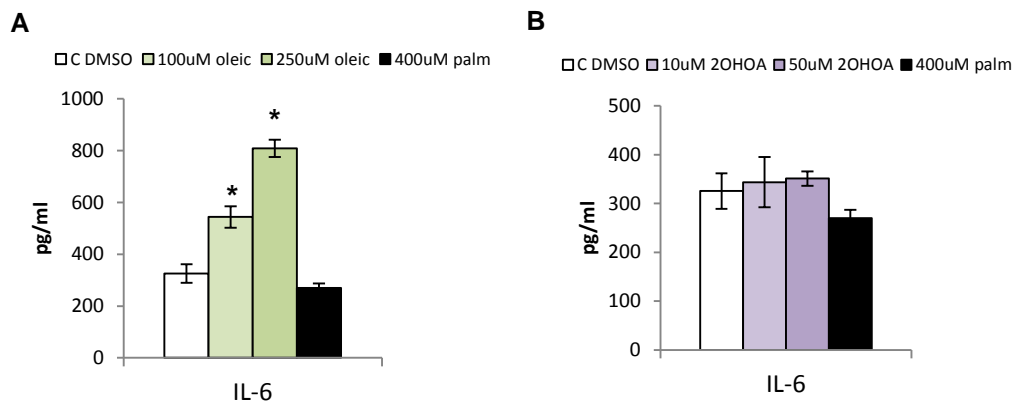
Mesurarem la IL-6 al medi de cultiu mitjançant ELISA als cultius tractats amb OA i 2OHOA on havíem vist canvis significatius a nivell transcripcional (comparat amb la IL-6 en el medi de cultius tractats amb vehicle i palmitat). En el cas de l'OA, en concordança amb els resultats representats en la **Figura 4A** on es veié un increment en la expressió de ARNm IL-6, es veié un increment de la proteïna IL-6 en el medi de cultiu a les mateixes dues concentracions que hi havia hagut significança (**Figura 5A**).

En canvi, no hi hagué canvis significatius de la proteïna IL-6 en el medi de cultiu dels miotubs C2C12 tractats amb 2OHOA (**Figura 5B**) ni amb l'àcid palmític (**Figura 5**).



**Figura 4.** Expressió d'ARNm de IL6, Fgf21, Fndc5 i Pgc1  $\alpha$  en resposta a 24h de tractament amb **(A)** àcid oleic (100µM i 250µM) i palmític (400 µM) **(B)** àcid 2hidroxioleic (10µM, 50µM i 100 µM) i palmític (400 µM) **(C)** hidroxitirosol (25µM, 50µM i 100 µM). L'expressió de ARNm s'expressa en front el grup control (miotubs tractats amb el vehicle DMSO en **(A)** i **(B)** i H<sub>2</sub>O en **(C)**) considerat el 100%. Es representa la mitjana  $\pm$  error típic d'un experiment realitzat per quadruplicat. Cada tractament es compara amb el control (vehicle) mitjançant la prova t-Student, \* indica diferències significatives ( $p < 0.05$ ).





**Figura 5.** Proteïna IL-6 en el medi de cultiu després de 24h de tractament amb **(A)** àcid oleic (100µM i 250µM) i palmític (400 µM) **(B)** àcid 2 hidroxioleic (10µM i 50µM) i palmític (400 µM) mesurada mitjançant una ELISA. Les dades es troben representades per la mitjana ± error típic de l'experiment realitzat per triplicat o quadruplicat. Cada tractament es compara amb el control (vehicle) mitjançant la prova t-Student, \* indica diferències significatives ( $p < 0.05$ ).

## 2.4. DISCUSSIÓ

Hi ha molt pocs estudis sobre l'efecte directe d'àcids grassos concrets damunt l'expressió de mioquines. Aquí hem pogut constatar alguns efectes interessants en aquest sentit de l'àcid oleic i el seu derivat sintètic, l'àcid 2 hidroxioleic.

Segons els resultats obtinguts aquí, amb l'àcid oleic hi ha un increment tant de l'expressió d'**IL-6** a nivell transcripcional com de la concentració de la proteïna acumulada en el medi. Això ja es veïa en el treball de Granados et al. [47] on a les cèl·lules tractades amb OA també augmentà l'expressió d'aquesta citoquina. S'usà, d'igual manera que aquí, el tipus cel·lular C2C12, i tractament a una concentració de 20, 100 i 500µM durant 24h [47]. A diferència del nostre experiment, la major expressió de IL6 fou a 500µM, en canvi, en el nostre cas, amb el tractament a una concentració de 400µM les cèl·lules a les 24h de tractament havien mort, com es veu a la **Figura 3d**. Tant l'augment de IL-6 en expressió com en proteïna en medi es va veure també en un experiment realitzat per [48] on s'usà una mescla equimolar d'àcid oleic i àcid linoleic dissolts en etanol a 700µM, a 24h fou significativa.

Granados et al. [47] comparà l'àcid oleic amb el seu isòmer trans, l'àcid elaídric, i sols l'oleic induí l'expressió de IL-6 a les cèl·lules musculars C2C12. En el nostre cas introduïrem el palmític, que no s'havia provat prèviament, veient que tampoc no té els efectes de l'oleic sobre l'expressió de IL-6. Això vol dir que l'estructura de l'àcid oleic i la forma de la seva insaturació (*cis*) és clau per el seu efecte inductor de la IL-6 en cèl·lules musculars. A més del

seu possible paper inductor de la marronització del TAB, la IL-6 té efectes positius al múscul (apartat 1.2.2.) que, d'acord amb els resultats obtinguts (aquest treball i [47]), podrien estar potenciats per l'àcid oleic en comparació amb el greix saturat i el greix trans.

En quant a les cèl·lules tractades amb 2OHOA, hem vist un increment també en la expressió de IL-6 a nivell transcripcional amb el tractament a una concentració de 50µM. És a dir, amb un quint de la concentració de l'OA tenim els mateixos efectes en l'expressió d'aquesta molècula a nivell de ARNm. Això podria implicar que només afegint el OH en la posició 2 de l'àcid oleic, es veu incrementada la seva potencia per aquest efecte transcripcional. No obstant no hem pogut constatar un augment a nivell de la proteïna acumulada al medi.

En quant a **Fgf21**, podem veure una disminució significativa tant amb el tractament amb OA 250µM com amb el seu sintètic 2OHOA a 50µM. Això es podria relacionar amb la relació que es plantegen nous estudis. Fgf21 pot ser un factor que es veu induït a conseqüència de l'estrès [34], en concret es veu que es produeix de manera rellevant baix condicions d'estrès mitocondrial muscular [50]. La baixada podria temptativament relacionar-se aleshores amb un efecte antiestrès de l'OA i el 2OHOA sobre el metabolisme dels miotubs que concordaria amb els efectes metabòlics positius descrits per ambdós composts.

L'expressió del gen **Fndc5** també es reduí significativament amb el tractament amb OA a 250µM. A un treball previ, un tractament de 24h amb una mescla de oleic i linoleic no va afectar a l'expressió de Fndc5 a miotubs C2C12 [48]. Es suggereix idò, un efecte compensatori del linoleic.

PGC-1α és un cofactor de diversos factors de transcripció clau en el metabolisme del múscul esquelètic. Es veu incrementat durant l'exercici, i s'ha relacionat amb l'expressió de certes mioquines [51] com la irisina (revisat a [6]). Volguérem mirar si els composts nutricionals elegits podrien afectar l'expressió d'aquesta molècula. No veim cap canvi significatiu en l'expressió de **Pgc-1α** amb cap tractament. En el cas de [48] es veié que es necessita, a més del tractament amb la mescla d'àcids grassos, una activació de l'AMPK (amb AICAR) per induir l'expressió de PGC-1α. Això indicaria que els àcids grassos de per si no són suficients per induir l'expressió d'aquest gen.

Aquest estudi és preliminar i té limitacions. S'hauria de repetir per tal de tenir al manco 3 cultius independents. A més, seria interessant comprovar FGF21 a nivell de proteïna al medi de

cultiu. També, per acabar d'arrodonir i relacionar l'efecte directe dels àcids grassos elegits damunt la marronització a través de l'expressió de mioquines, un possible experiment seria realitzar un cocultiu amb miotubs diferenciats C2C12 tractats i cèl·lules del teixit adipós blanc. Veient així el 'diàleg' entre aquests dos teixits. Es podria mirar tant l'expressió de mioquines en els miotubs com en el medi i veure l'efecte damunt l'expressió de gens que es consideren característics de TAM al teixit adipós blanc. També l'estudi es podria completar testant la ocurrència o no dels efectes observats als miotubs en cultiu en animals tractats *in vivo* amb els composts problema.

En tot cas, el potencial de modular l'expressió de mioquines mitjançant components funcionals d'aliments i per altres vies és interessant de cara al control de l'homeòstasi metabòlica, i aquest treball presenta evidència d'algunes interaccions gen-nutrient concretes en aquest sentit. Així, l'OA i el 2OHOA tenen efectes directes sobre l'expressió de mioquines que han estat relacionades amb el procés de marronització, suggerint que podrien contribuir a la modulació del 'diàleg' múscul-teixit adipós.

### 3. CONCLUSIONS

- ✚ A més dels dos tipus clàssics d'adipòcits, els blancs que duen a terme l'emmagatzematge de triglicèrids i els marrons que duen a terme la termogènesi mitjançant UCP1, els adipòcits beix s'estan estudiant com a tercer tipus. Aquests s'indueixen mitjançant la marronització i adquireixen característiques dels adipòcits marrons.
- ✚ La marronització del teixit adipós blanc pot suposar una nova diana terapèutica per combatre la obesitat.
- ✚ Les mioquines són molècules secretades per el múscul esquelètic amb efectes endocrins.
- ✚ Diverses mioquines han estat implicades en el control del procés de marronització del teixit adipós blanc.
- ✚ Entre aquestes mioquines trobam IL-6, FGF21, irisina, miostatina, apelina, IL-15 i baiba.
- ✚ El procés de marronització es veu influït per nutrients i altres components alimentaris entre els que destacam la fucoxantina, el resveratrol, l'àcid linoleic conjugat i l'àcid 2 hidroxioleic.
- ✚ Aquests factors dietètics podrien actuar, entre d'altres maneres, mitjançant la modulació de l'expressió de mioquines relacionades amb el procés de marronització. No obstant, hi ha molt pocs estudis al respecte.
- ✚ S'han estudiat els efectes del l'àcid oleic, l'àcid 2 hidroxioleic, l'àcid palmític i l'hidroxitirosol damunt l'expressió de mioquines seleccionades en miotubs diferenciats C2C12.
- ✚ Els tractaments amb àcid oleic i àcid 2 hidroxioleic, però no palmític, induïren l'expressió de l'ARNm IL-6 i disminuïren l'expressió de l'ARNm Fgf21.
- ✚ El tractament amb àcid oleic induí així mateix un increment de la proteïna IL-6 acumulada en el medi de cultiu. El tractament amb 2 hidroxioleic no produí canvis a nivell de IL-6 acumulada en el medi de cultiu, encara que induí l'expressió de l'ARNm IL-6 amb més potència que l'àcid oleic.
- ✚ Els nivells de l'ARNm de Fndc5 (precursor de la irisina) es trobaren disminuïts selectivament en els miotubs tractats amb àcid oleic.
- ✚ El tractament amb hidroxitirosol no va afectar l'expressió de cap de les mioquines analitzades en les condicions assajades.

#### 4. BIBLIOGRAFIA

- [1] A. Palou and M. L. Bonet, "Challenges in obesity research.," *Nutr. Hosp.*, vol. 28 Suppl 5, pp. 144–53, Sep. 2013.
- [2] J. Sanchez-Gurmaches and D. A. Guertin, "Adipocyte lineages: tracing back the origins of fat.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1842, no. 3, pp. 340–51, Mar. 2014.
- [3] M. Harms and P. Seale, "Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential.," *Nat. Med.*, vol. 19, no. 10, pp. 1252–63, Oct. 2013.
- [4] M. Rosenwald and C. Wolfrum, "The origin and definition of brite versus white and classical brown adipocytes.," *Adipocyte*, vol. 3, no. 1, pp. 4–9, Jan. 2014.
- [5] M. L. Bonet, P. Oliver, and A. Palou, "Pharmacological and nutritional agents promoting browning of white adipose tissue.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1831, no. 5, pp. 969–85, May 2013.
- [6] K. A. Lo and L. Sun, "Turning WAT into BAT: a review on regulators controlling the browning of white adipocytes.," *Biosci. Rep.*, vol. 33, no. 5, Jan. 2013.
- [7] J. Wu, P. Cohen, and B. M. Spiegelman, "Adaptive thermogenesis in adipocytes: is beige the new brown?," *Genes Dev.*, vol. 27, no. 3, pp. 234–50, Feb. 2013.
- [8] A. M. Rodríguez, J. Sánchez, A. Tobaruela, T. Priego, C. Picó, and A. Palou, "Time-course effects of increased fatty acid supply on the expression of genes involved in lipid/glucose metabolism in muscle cells.," *Cell. Physiol. Biochem.*, vol. 25, no. 2–3, pp. 337–46, Jan. 2010.
- [9] P. Trayhurn, C. A. Drevon, and J. Eckel, "Secreted proteins from adipose tissue and skeletal muscle - adipokines, myokines and adipose/muscle cross-talk.," *Arch. Physiol. Biochem.*, vol. 117, no. 2, pp. 47–56, May 2011.
- [10] B. K. Pedersen and M. A. Febbraio, "Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ.," *Nat. Rev. Endocrinol.*, vol. 8, no. 8, pp. 457–65, Aug. 2012.
- [11] S. Raschke and J. Eckel, "Adipo-myokines: two sides of the same coin--mediators of inflammation and mediators of exercise.," *Mediators Inflamm.*, vol. 2013, p. 320724, Jan. 2013.
- [12] B. K. Pedersen, A. Steensberg, C. Fischer, C. Keller, P. Keller, P. Plomgaard, M. Febbraio, and B. Saltin, "Searching for the exercise factor: is IL-6 a candidate?," *J. Muscle Res. Cell Motil.*, vol. 24, no. 2–3, pp. 113–9, Jan. 2003.
- [13] A. C. McPherron, A. M. Lawler, and S. J. Lee, "Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member.," *Nature*, vol. 387, no. 6628, pp. 83–90, May 1997.
- [14] K. Ostrowski, T. Rohde, M. Zacho, S. Asp, and B. K. Pedersen, "Evidence that interleukin-6 is produced in human skeletal muscle during prolonged running.," *J. Physiol.*, vol. 508 ( Pt 3, pp. 949–53, May 1998.
- [15] K. Komolka, E. Albrecht, K. Wimmers, J. J. Michal, and S. Maak, "Molecular heterogeneities of adipose depots - potential effects on adipose-muscle cross-talk in humans, mice and farm animals.," *J. genomics*, vol. 2, pp. 31–44, Jan. 2014.
- [16] M. M. Seldin and G. W. Wong, "Regulation of tissue crosstalk by skeletal muscle-derived myonectin and other myokines.," *Adipocyte*, vol. 1, no. 4, pp. 200–202, Oct. 2012.
- [17] T. Shan, X. Liang, P. Bi, and S. Kuang, "Myostatin knockout drives browning of white adipose tissue through activating the AMPK-PGC1 $\alpha$ -Fndc5 pathway in muscle.," *FASEB J.*, vol. 27, no. 5, pp. 1981–9, May 2013.
- [18] P. Boström, J. Wu, M. P. Jedrychowski, A. Korde, L. Ye, J. C. Lo, K. A. Rasbach, E. A. Boström, J. H. Choi, J. Z. Long, S. Kajimura, M. C. Zingaretti, B. F. Vind, H. Tu, S. Cinti, K. Højlund, S. P. Gygi, and B. M. Spiegelman, "A PGC1- $\alpha$ -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis.," *Nature*, vol. 481, no. 7382, pp. 463–8, Jan. 2012.
- [19] R. D. Mahajan and S. K. Patra, "Irisin, a novel myokine responsible for exercise induced browning of white adipose tissue.," *Indian J. Clin. Biochem.*, vol. 28, no. 1, pp. 102–3, Jan. 2013.
- [20] K. Eckardt, S. W. Görgens, S. Raschke, and J. Eckel, "Myokines in insulin resistance and type 2 diabetes.," *Diabetologia*, vol. 57, no. 6, pp. 1087–99, Jun. 2014.
- [21] T. J. Schulz and Y.-H. Tseng, "Brown adipose tissue: development, metabolism and beyond.," *Biochem. J.*, vol. 453, no. 2, pp. 167–78, Jul. 2013.
- [22] L. Pedersen and P. Hojman, "Muscle-to-organ cross talk mediated by myokines.," *Adipocyte*, vol. 1, no. 3, pp. 164–167, Jul. 2012.
- [23] A. Bartelt and J. Heeren, "Adipose tissue browning and metabolic health.," *Nat. Rev. Endocrinol.*, vol. 10, no. 1, pp. 24–36, Jan. 2014.
- [24] A.-L. Poher, J. Altirriba, C. Veyrat-Durebex, and F. Rohner-Jeanrenaud, "Brown adipose tissue activity as a target for the treatment of obesity/insulin resistance.," *Front. Physiol.*, vol. 6, p. 4, Jan. 2015.
- [25] S. Kajimura and M. Saito, "A new era in brown adipose tissue biology: molecular control of brown fat development and energy homeostasis.," *Annu. Rev. Physiol.*, vol. 76, pp. 225–49, Jan. 2014.
- [26] B. K. Pedersen, "Muscles and their myokines.," *J. Exp. Biol.*, vol. 214, no. Pt 2, pp. 337–46, Jan. 2011.
- [27] M. Murakami and T. Hirano, "The pathological and physiological roles of IL-6 amplifier activation.," *Int. J. Biol. Sci.*, vol. 8, no. 9, pp. 1267–80, Jan. 2012.
- [28] M. Dalamaga, "Interplay of adipokines and myokines in cancer pathophysiology: Emerging therapeutic implications.," *World J. Exp. Med.*, vol. 3, no. 3, pp. 26–33, Aug. 2013.

- [29] M. Petruzzelli, M. Schweiger, R. Schreiber, R. Campos-Olivas, M. Tsoli, J. Allen, M. Swarbrick, S. Rose-John, M. Rincon, G. Robertson, R. Zechner, and E. F. Wagner, "A switch from white to brown fat increases energy expenditure in cancer-associated cachexia," *Cell Metab.*, vol. 20, no. 3, pp. 433–47, Sep. 2014.
- [30] K. C. H. Fearon, D. J. Glass, and D. C. Guttridge, "Cancer cachexia: mediators, signaling, and metabolic pathways," *Cell Metab.*, vol. 16, no. 2, pp. 153–66, Aug. 2012.
- [31] M. Tsoli and G. Robertson, "Cancer cachexia: malignant inflammation, tumorkines, and metabolic mayhem," *Trends Endocrinol. Metab.*, vol. 24, no. 4, pp. 174–83, Apr. 2013.
- [32] N. Itoh, "FGF21 as a Hepatokine, Adipokine, and Myokine in Metabolism and Diseases," *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, vol. 5, p. 107, Jan. 2014.
- [33] K. Walsh, "Adipokines, myokines and cardiovascular disease," *Circ. J.*, vol. 73, no. 1, pp. 13–8, Jan. 2009.
- [34] K. H. Kim and M.-S. Lee, "FGF21 as a Stress Hormone: The Roles of FGF21 in Stress Adaptation and the Treatment of Metabolic Diseases," *Diabetes Metab. J.*, vol. 38, no. 4, pp. 245–51, Aug. 2014.
- [35] A. Besse-Patin, E. Montastier, C. Vinel, I. Castan-Laurell, K. Louche, C. Dray, D. Daviaud, L. Mir, M.-A. Marques, C. Thalamas, P. Valet, D. Langin, C. Moro, and N. Viguierie, "Effect of endurance training on skeletal muscle myokine expression in obese men: identification of apelin as a novel myokine," *Int. J. Obes. (Lond)*, vol. 38, no. 5, pp. 707–13, May 2014.
- [36] A. Than, H. L. He, S. H. Chua, D. Xu, L. Sun, M. K.-S. Leow, and P. Chen, "Apelin enhances brown adipogenesis and browning of white adipocytes," *J. Biol. Chem.*, Apr. 2015.
- [37] V. Almendro, G. Fuster, S. Busquets, E. Ametller, M. Figueras, J. M. Argilés, and F. J. López-Soriano, "Effects of IL-15 on rat brown adipose tissue: uncoupling proteins and PPARs," *Obesity (Silver Spring)*, vol. 16, no. 2, pp. 285–9, Feb. 2008.
- [38] M. P. Abbott and L. Turcotte, "IL15 Promotes Myogenic and Brown Adipose Tissue Associated Genes while Decreasing AMPK Activation in C2C12 Skeletal Muscle Cells," *FASEB J.*, vol. 29, no. 1\_Supplement, p. 826.3–, Apr. 2015.
- [39] L. D. Roberts, P. Boström, J. F. O'Sullivan, R. T. Schinzel, G. D. Lewis, A. Dejam, Y.-K. Lee, M. J. Palma, S. Calhoun, A. Georgiadi, M.-H. Chen, V. S. Ramachandran, M. G. Larson, C. Bouchard, T. Rankinen, A. L. Souza, C. B. Clish, T. J. Wang, J. L. Estall, A. A. Soukas, C. A. Cowan, B. M. Spiegelman, and R. E. Gerszten, "β-Aminoisobutyric acid induces browning of white fat and hepatic β-oxidation and is inversely correlated with cardiometabolic risk factors," *Cell Metab.*, vol. 19, no. 1, pp. 96–108, Jan. 2014.
- [40] H. L. Kammoun and M. A. Febbraio, "Come on BAIBA light my fire," *Cell Metab.*, vol. 19, no. 1, pp. 1–2, Jan. 2014.
- [41] V. M. Rodríguez, M. P. Portillo, C. Picó, M. T. Macarulla, and A. Palou, "Olive oil feeding up-regulates uncoupling protein genes in rat brown adipose tissue and skeletal muscle," *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 75, no. 2, pp. 213–20, Feb. 2002.
- [42] T. Priego, J. Sánchez, A. P. García, A. Palou, and C. Picó, "Maternal dietary fat affects milk fatty acid profile and impacts on weight gain and thermogenic capacity of suckling rats," *Lipids*, vol. 48, no. 5, pp. 481–95, May 2013.
- [43] O. Vögler, A. López-Bellan, R. Alemany, S. Tofé, M. González, J. Quevedo, V. Pereg, F. Barceló, and P. V. Escriba, "Structure-effect relation of C18 long-chain fatty acids in the reduction of body weight in rats," *Int. J. Obes. (Lond)*, vol. 32, no. 3, pp. 464–73, Mar. 2008.
- [44] Y. Oi-Kano, T. Kawada, T. Watanabe, F. Koyama, K. Watanabe, R. Senbongi, and K. Iwai, "Oleuropein, a phenolic compound in extra virgin olive oil, increases uncoupling protein 1 content in brown adipose tissue and enhances noradrenaline and adrenaline secretions in rats," *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*, vol. 54, no. 5, pp. 363–70, Oct. 2008.
- [45] Y. Oi-Kano, T. Kawada, T. Watanabe, F. Koyama, K. Watanabe, R. Senbongi, and K. Iwai, "Extra virgin olive oil increases uncoupling protein 1 content in brown adipose tissue and enhances noradrenaline and adrenaline secretions in rats," *J. Nutr. Biochem.*, vol. 18, no. 10, pp. 685–92, Oct. 2007.
- [46] C. Vilaplana-Pérez, D. Auñón, L. A. García-Flores, and A. Gil-Izquierdo, "Hydroxytyrosol and potential uses in cardiovascular diseases, cancer, and AIDS," *Front. Nutr.*, vol. 1, p. 18, Jan. 2014.
- [47] N. Granados, J. Amengual, J. Ribot, A. Palou, and M. L. Bonet, "Distinct effects of oleic acid and its trans-isomer elaidic acid on the expression of myokines and adipokines in cell models," *Br. J. Nutr.*, 2011.
- [48] J. Sánchez, Y. Nozhenko, A. Palou, and A. M. Rodríguez, "Free fatty acid effects on myokine production in combination with exercise mimetics," *Mol. Nutr. Food Res.*, vol. 57, no. 8, pp. 1456–67, Aug. 2013.
- [49] M. W. Pfaffl, "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR," *Nucleic Acids Res.*, vol. 29, no. 9, p. e45, May 2001.
- [50] F. Ribas, J. Villarroya, E. Hondares, M. Giralt, and F. Villarroya, "FGF21 expression and release in muscle cells: involvement of MyoD and regulation by mitochondria-driven signalling," *Biochem. J.*, vol. 463, no. 2, pp. 191–9, Oct. 2014.
- [51] H. Liang and W. F. Ward, "PGC-1α: a key regulator of energy metabolism," *Adv. Physiol. Educ.*, vol. 30, no. 4, pp. 145–51, Dec. 2006.

## ANNEXOS


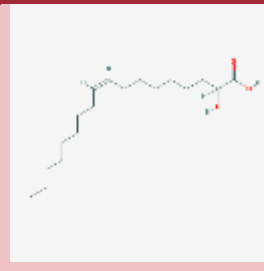
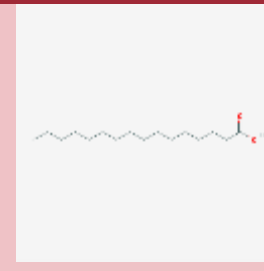
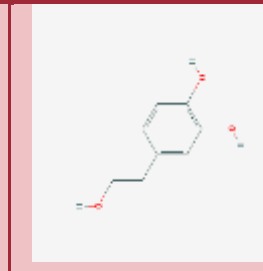
**Taula 2.** Característiques de la línia cel·lular C2C12.

C2C12	Organisme	Teixit	Tipus cel·lular	morfologia	Propietats de cultiu	Nivell de bioseguretat	Cadena
ATCC®CRL-1772™	Ratolí ( <i>Mus musculus</i> )	Múscul	Mioblast	Mioblast	Adherent	1	C3H

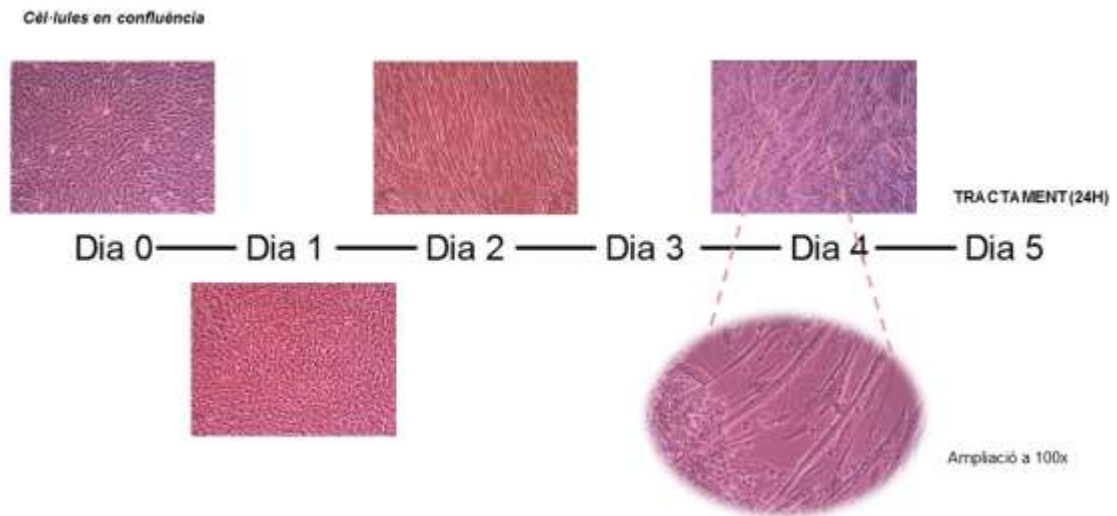
**Taula 3.** Llistat d'encebadors usats per la RTqPCR.

Gen	Encebador 'forward' (5' a 3')	Encebador 'reverse' (5' a 3')	Amplada de l'amplicó (pb)
<b>FGF21</b>	AGGCTTTGACACCCAGGATT	ACAGATGACGACCAGGACAC	145
<b>IL-6</b>	TGGGAAATCGTGGAAATGAG	GAAGGACTCTGGCTTTGTCTT	245
<b>FNDC5</b>	ATGAAGGAGATGGGGAGGAA	GCGGCAGAAGAGAGCTATAACA	102
<b>PGC-1<math>\alpha</math></b>	CATTTGATGCACTGACAGATGGA	CCGTCAAGGCATGGAGGAA	69

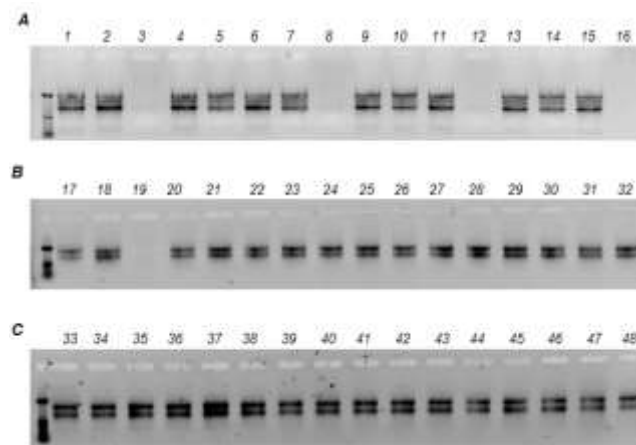
**Taula 4.** Estructures moleculars dels àcids grassos utilitzats al tractament.

Àcid oleic	Àcid 2 hidroxioleic	Àcid palmític	Hidroxitirosol
			
Per a més informació: <a href="http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/oleic_acid#section=Top">http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/oleic_acid#section=Top</a>	Per a més informació: <a href="http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/9796304#section=2D-Structure">http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/9796304#section=2D-Structure</a>	Per a més informació: <a href="http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/82755#section=n=Top">http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/82755#section=n=Top</a>	Per a més informació: <a href="http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/985#section=Top">http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/985#section=Top</a>

**Figura 6.** Imatges de microscòpia durant el procés de diferenciació cel·lular de miòcits a miotubs. Les imatges es realitzaren a 40 augments.



#### COMPROBACIÓ DE LA INTEGRITAT DE L'ARN



**Figura 7.** Imatges de la resolució de l'ARN per electroforesis en gel d'agarosa a l'1%. Es mira la integritat de l'ARN total extret dels miotubs diferenciats C2C12 exposats als diferents tractaments: vehicle DMSO, OA, 2OHOA, PA, vehicle H<sub>2</sub>O i HT. Les mostres s'agafaren a l'atzar per evitar el factor placa. Es carregaren 3µl d'ARN total a cada pouet. La quantitat d'ARN extret a les mostres 3,8,12 (A) i 19 (B) tractades amb àcid oleic 400µM no fou detectable mitjançant l'electroforesi (aquestes cèl·lules havien mort, vegeu **Figura 3d** i la quantitat quantificada mitjançant NanoDrop fou molt baixa). La mostra 16 (A) tractada amb HT 50µM no fou eluïda correctament en la tècnica d'extracció d'ARN total i també fou eliminada de l'experiment. Es comprova la integritat de l'ARN total extret de la resta de les mostres.