

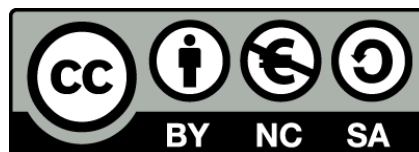


UNIVERSITAT DE
BARCELONA

GDFI5, un nou factor secretable regulador del metabolisme

**Paper com a “batoquina” en models experimentals,
i estudis en humans**

Laura Campderrós Traver



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – Compartir Igual 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – Compartir Igual 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0. Spain License.**

GDF15, un nou factor secretable regulador del metabolisme

Paper com a "batoquina" en models experimentals,
i estudis en humans



Laura Campderrós Traver
Tesi doctoral
2019





UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Grup de Metabolisme Molecular i Patologies associades

Departament de Bioquímica i Biomedicina Molecular

Facultat de Biologia

Programa de Doctorat en Biomedicina

GDF15, un nou factor secretable regulador del metabolisme. Paper com a “batoquina” en models experimentals, i estudis en humans

Memòria presentada per

Laura Campderrós Traver

per optar al grau de doctora per la Universitat de Barcelona

Laura Campderrós Traver

Firma dels directors

Dr. Francesc Villarroya i Gombau

Dr. Joan Villarroya i Terrade

Barcelona, 2019

AGRAÏMENTS

Començo a escriure els agraïments i sóc molt conscient que aquest apartat és un dels pocs apartats (o l'únic) que llegirà la majoria dels qui agafin aquesta tesi. No els culpo, jo també he fet el mateix! Ara bé, reconec que abans de posar-me a escriure aquest apartat pensava que això dels agraïments era cosa fàcil després d'haver escrit la tesi. Resulta però, que no és tant senzill com sembla, ja que és massa fàcil desconcentrar-se tot recordant històries viscudes durant aquests més de 4 anys.

Però centrem-nos! Ara ja fa, com he dit, més de quatre anys que vaig arribar al TAM. Un laboratori que, des de fora feia una mica de respecte! Res més allunyat de la realitat que vaig descobrir un cop dins.

Per començar, el Francesc i la Marta, quins dos grans científics i quines dues grans persones!! M'heu fet créixer com a investigadora, però també, i sobretot, com a persona. No m'estranya que el laboratori del TAM sigui una família tenint-vos a vosaltres dos al cap davant. Gràcies per tot!

Joan, em vas ajudar des del primer dia. Sempre que t'he demanat qualsevol cosa has estat allà per ajudar i aconsellar (això pel que et toca com a codirector), com a company, sempre disposat a compartir moments de cerveses i riures.

Però aquesta tesi també ha estat possible gràcies a tota la resta de la família del TAM.

No hauria pogut concentrar-me sense els esmorzars amb la Merche, l'Anna, la Marion i el Joan. Merche, no sé que hauria fet sense tu! Fas que el TAM funcioni, i els teus "bon dia bonica" poden alegrar el dia a qualsevol. Àlex, Aleix, Joan i Moisès, deu ni do quin grupet! Feu que estar al TAM1 sigui molt divertit! Tania, ho sento pel Pedraforca!! I gràcies per no tenir mai un no per resposta, sempre allà disposada a ajudar. Gemma, la bondat en persona! Quantes estones de després de dinar compartides!! Encara tenim pendent una barbacoa a Vic eh! El tàndem Celia i Samantha, quins riures amb aquestes dues!! Sou l'hòstia! Ah i Sam, per quan una excursió? Que ara ja se que t'agrada la muntanya. Rubén, l'informàtic del TAM! Sempre disposat a ajudar (i a passar-nos l'últim capítol de GOT). L'Albert, el futur bomber! Ànims amb les opos! Montse i Marion, que us puc dir... masses cerveses i moments compartits que no puc resumir! (millor ho deixem per un dia de muntanya, o de platja eh). Alberts (així en plural), molts ànims amb el TFG i amb tot el que vindrà.

Ibon, Ricardo, quin parell... entre la discoteca del TAM 3 i els comentaris de Ricardo deu ni do! (tots ja sabem quins comentaris...). Se us troba a faltar! Aina, tampoc m'oblido de tu! No vas estar massa temps però saps prou bé que hi vas deixar empremta!

Gràcies família per tots els moments viscuts tant fora com dins del laboratori, que no en són pocs! M'ho he passat molt bé amb vosaltres!

Xico, no sé si arribaràs a llegir aquests agraïments, però no podia no agrair a la primera persona que em va ajudar en un laboratori. També és gràcies a tu si avui aquesta tesi és real. I per descomptat, a les meves dues primeres mentores en el món de la ciència, Anna i Marta. Tot va començar a Insulina! (Eh Celia!)

Però no només la gent del món de la ciència m'ha hagut d'aguantar amb la tesi...

Carles i David! Quantes vegades us hauré parlat de la tesi mentre pujàvem qualsevol muntanya... nois, de veritat em sap greu haver donat tant pel sac! Tots cansats vinga amunt i jo vinga a parlar del teixit adipós marró.

Anna i Marta, companyes de viatge des de la universitat! Dues a Barcelona i una Zurich! Però no importa, seguim aquí compartint els moments importants (i els viatges dels estius!). Gràcies per aguantar-me des de fa anys.

I com no, pels que sempre hi són (vulguin o no), mons pares i el Marc. Sempre allà disposats a escoltar que fa el teixit adipós marró i GDF15. Quan encara estava a casa, arribava cansada del laboratori i sempre hem trobava el sopar i el *tuper* fet!! Gràcies Mama!!! Papa, per les excursions per la muntanya mentre t'explicava tota la tesi! Marc, em sap greu, toquen els germans que toquen! Gràcies per seguir-me escoltant encara ara.

Finalment a tu Aleix, de fora del laboratori possiblement el que més m'ha hagut d'aguantar. De fet, ja fa un temps que m'aguantes cada dia al arribar a casa cansada i parlant dels meus "agobios". Gràcies per tota la paciència! I per cuinar i treure la Bruna moltes vegades que em tocava a mi!

Sense algú de vosaltres aquesta tesi no seria el que és. Cada un de vosaltres m'ha aportat una cosa única que ha fet que aquesta tesi sigui com és, i que avui jo pugui estar escrivint aquestes pàgines d'agraïments. També us demano perdó a tots per tots aquells moments que he dona pel sac amb la tesi! I si m'he deixat algú perdoneu-me, no és de mala fe, són coses dels nervis.

Moltes gràcies a tots, de veritat!

Aquesta tesi va per tots vosaltres.

CONTINGUT

La present tesi doctoral, que porta per títol **GDF15, un nou factor secretable regulador del metabolisme. Paper com a batoquina en models experimentals, i estudis en humans**, ha estat realitzada en el grup de Metabolisme i Patologies associades del departament de Bioquímica i Biomedicina Molecular de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona, sota la direcció del Dr. Francesc Villarroya Gombau i del Dr. Joan Villarroya Terrade.

La memòria ha estat estructurada segons la normativa vigent pel que fa a format de tesi clàssica establert per la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona i, per tant, consta dels següents apartats:

Llistat d'abreviatures

Introducció

Objectius

Material i mètodes

Resultats

Discussió

Conclusions

Bibliografia

Apèndix

Durant el desenvolupament d'aquesta tesi es va poder publicar una part dels resultats obtinguts. Aquesta publicació es troba adjuntada en l'apartat d'**Apèndix**.

- GDF-15 is elevated in children with mitochondrial diseases and is induced by mitochondrial dysfunction. PLoS One, 2016

ÍNDEX

AGRAÏMENTS.....	3
CONTINGUT.....	7
ÍNDEX	11
LLISTAT D'ABREVIATURES.....	17
INTRODUCCIÓ	21
1. EL TEIXIT ADIPÓS.....	23
1.1. L'epidèmia de l'obesitat.....	23
1.2. Organització del teixit adipós.....	24
1.3. Classificació dels diferents teixits adiposos.....	25
1.3.1. El teixit adipós blanc.....	26
1.3.2. El teixit adipós marró.....	27
1.3.3. Els adipòcits beix/brite.....	28
1.3.4. El teixit adipós del moll de l'os.....	29
1.4. Distribució dels teixits adiposos en l'organisme.....	29
1.4.1. Dipòsits de teixit adipós blanc en ratolins.....	30
1.4.2. Dipòsits de teixit adipós marró en ratolins.....	30
1.5. EL teixit adipós marró.....	31
1.5.1. Funció principal: La termogènesi adaptativa.....	31
1.5.2. Funció com a òrgan endocrí.....	37
1.5.3. Diferenciació dels adipòcits marrons.....	38
1.5.4. Els macròfags del teixit adipós marró.....	42
2. EL FACTOR GDF15.....	45
2.1. La família TGF β	45
2.1.1. Estructura dels membres de la família TGF β	47
2.1.2. Senyalització de les proteïnes de la família TGF β	48
2.1.3. Senyalització de la subfamília distant GDNF.....	49
2.2. GDF15, un membre divergent de la família TGF β	50
2.2.1. Estructura de GDF15.....	50
2.2.2. GFRAL: El receptor de GDF15.....	54
2.2.3. GDF15 com a biomarcador de patologia.....	55
2.2.4. GDF15 en condicions no patològiques.....	61
2.2.5. Acció central de GDF15 – Efectes anorexigènics de GDF15.....	63
2.2.6. Acció perifèrica de GDF15.....	65

2.2.7.	GDF15 i el teixit adipós.....	67
3.	LA PROTEÏNA FGF21	68
3.1.	La família dels FGF.....	68
3.2.	FGF21	71
3.2.1.	Regulació d'FGF21 durant el dejuni i l'alimentació	72
3.2.2.	Regulació d'FGF21 durant l'exercici	74
3.2.3.	Regulació d'FGF21 en resposta al dany mitocondrial.....	74
OBJECTIUS.....		77
MATERIALS I MÈTODES		81
1.	Models animals.....	83
2.	Cultius cel·lulars.....	84
2.1.	Cultius primaris d'adipòcits	84
2.2.	Cultius d'adipòcits marrons immortalitzats.....	85
2.3.	Cultius d'adipòcits marrons HIB-1B.....	86
2.4.	Cultiu d'adipòcits SGBS.....	86
2.5.	Cultius cel·lulars de miotubs.....	87
2.6.	Cultiu de macròfags RAW 264.7	88
3.	Transfecció transitòria i mesura de l'activitat del promotor.....	89
4.	Experiments amb medis condicionats	89
5.	Immunofluorescència.....	90
6.	Aïllament d' RNA i PCR quantitativa en temps real.....	91
6.1.	Purificació d'RNA mitjançant columnes d'afinitat.....	91
6.2.	Purificació d'RNA mitjançant fenol-cloroform	91
6.3.	Transcripció reversa.....	91
6.4.	PCR quantitativa en temps real.....	92
7.	Western blot.....	93
7.1.	Obtenció d'extractes proteics a partir de cultius cel·lulars i de mostres de teixit.....	93
7.2.	Electroforesi, transferència i immunodetecció	93
8.	Quantificació de proteïnes solubles	94
9.	Clonació.....	94
9.1.	Miniprep i comprovació de la colònia.....	95
9.2.	Maxiprep.....	95

10.	Adipòcits marrons GDF15 KD.....	97
11.	Estudis en humans.....	97
11.1.	Estudi durant el desenvolupament neonatal i infantil.....	97
11.2.	Estudi dels efectes de l'exercici intens (Estudi marató Barcelona 2017).....	99
12.	Anàlisi estadística.....	100
RESULTATS.....		101
Part 1.	Estudis experimentals: Paper de GDF15 com a batoquina.....	103
	L'activació termogènica indueix l'expressió de GDF15 al teixit adipós marró.....	103
	L'activació noradrenèrgica, mitjançada per AMPc, de la termogènesi indueix tant l'expressió com la secreció de GDF15 per part dels adipòcits marrons.....	105
	L'activació termogènica dels adipòcits marrons provoca l'augment tant dels nivells de la proteïna GDF15 precursora com els nivells de la proteïna GDF15 madura.....	108
	Els efectes autocrins d'FGF21 estan implicats en la inducció de l'expressió de GDF15 en resposta a l'activació termogènica.....	109
	La proteïna GDF15 alliberada pels adipòcits marrons actua en els macròfags.....	114
Part 2.	Estudis en humans.....	118
	GDF15 com a biomarcador de patologia mitocondrial en població pediàtrica.....	118
	GDF15 durant el desenvolupament neonatal i infantil: Relació del guany de pes prenatal i postnatal.....	124
	GDF15 i FGF21 com a biomarcadors de resposta biològica a un exercici intens: un estudi en corredors de marató.....	128
DISCUSSIÓ.....		137
CONCLUSIONS.....		149
BIBLIOGRAFIA		153
APÈNDIX.....		175

LLISTAT D'ABREVIATURES

A continuació es mostra una relació, per ordre alfabètic, de les principals abreviatures i sigles emprades en la memòria de la present tesi doctoral. Entre parèntesi s'indiquen variants de proteïnes amb les mateixes sigles.

AGA	<i>Appropriate for gestational age</i> (nadons nascuts amb un pes adequat)
AMPc	Monofosfat d'adenosina cíclic
AP	Àrea postrema
ARG1	Arginasa 1
ATF2	Factor de transcripció activador 2
ATGL	Lipasa de triglicèrids adipocitària
ATP	Trifosfat d'adenosina
BMP	Proteïna morfogènica òssia
C/EBPβ	Proteïna d'unió a seqüència CCAAT i a potenciadors beta
CLEC10A	<i>C-type lectin domain family 10 member A</i>
CREB	Element d'unió en resposta a AMP cíclic
CVD	Malalties cardiovasculars
CXCL14	Lligand de tipus quimiocina amb motiu CXC 14
DNA	Àcid desoxiribonucleic
FGF(x)	Factor de creixement fibroblàstic (x= diversos números)
GDF(x)	Factor de creixement i diferenciació (x= diversos números)
GDNF	<i>Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor</i>
GFRα	<i>GDNF family receptors alpha</i>
GFRAL	<i>GDNF family receptors alpha-like</i>
HSL	Lipasa sensible a hormones
IL(x)	Interleucina (x=diversos números)
IMC	Índex de massa corporal
iNOS	Òxid nítric sintasa induïble
KLB	<i>β-klotho</i>
KO	<i>Knock-out</i>
LPS	Lipopolisacàrid
MCP1	Proteïna quimiotàctica per a monòcits 1
MDS	Síndrome de la depleció del DNA mitocondrial

MRC1	Receptor de la mannososa
NA	Noradrenalina o norepinefrina (NE)
NTS	Nucli de tracte solitari
P38 MAPK	Proteïna cinasa activada per mitògens p38
PGC1α	Coactivador de PPARgamma 1-alfa
PKA	Proteïna cinasa A
PPARα	<i>Peroxisome proliferator activated-receptor alpha</i>
PPARγ	<i>Peroxisome proliferator activated-receptor gamma</i>
PRDM16	<i>PR domain-containing 16</i>
ROS	Espècies reactives de l'oxigen
SGA	<i>Small for gestational age</i> (nadons nascuts amb un pes inferior a l'adequat)
SVF	Fracció de l'estroma vascular
TAB	Teixit adipós blanc
TABe	Teixit adipós blanc epididimal
TABi	Teixit adipós blanc inguinal
TAM	Teixit adipós marró
TAMi	Teixit adipós marró interescapular
TG	Triglicèrids
TGFβ	<i>Transforming growth factor beta</i>
TK2	Timidina cinasa 2
TNFα	Factor de necrosi tumoral alfa
UCP1	Proteïna desacobladora 1

INTRODUCCIÓ

1. EL TEIXIT ADIPÓS

1.1. L'epidèmia de l'obesitat

Actualment, l'obesitat és considerada un problema greu de salut pública que ha arribat a cotes d'epidèmia en tot el món, i que segueix augmentant any rere any. Segons dades de l'Organització Mundial de la Salut, a Europa, a l'any 2010 hi havia un 20,8% de la població diagnosticada d'obesitat mentre que a l'any 2016 aquest percentatge havia augmentat, representant un 23,3% de la població. Aquest fet va associat a canvis importants en l'alimentació dels individus i en la forma de vida; cada vegada es consumeixen aliments més processats que contenen més sucres i més greixos i, a la vegada, es realitza menys activitat física diària, portant a un balanç energètic positiu i, per tant, a l'acumulació de teixit adipós (Popkin et al., 2012).

El marcador generalment utilitzat per definir un individu amb obesitat és l'índex de massa corporal (IMC). L'IMC es defineix com el pes d'un individu en kilograms dividit per la seva alçada en metres al quadrat (kg/m^2). Amb aquest marcador podem classificar les persones en funció del seu estat nutricional, essent IMC < 18.5: pes insuficient, IMC entre 18.5 i 24.9: normopès, IMC entre 25 i 29.9: sobrepès, IMC entre 30 i 34.9: obesitat de grau 1, IMC entre 35 i 39.9: obesitat de grau 2 i IMC > 40: obesitat severa. Per tant, es considera que un individu presenta obesitat quan aquest té un IMC superior a 30 (Purnell, 2000).

L'excés de teixit adipós present en els individus amb obesitat es tradueix tant en un augment en el número d'adipòcits, com en un augment de la mida d'aquests. L'acumulació excessiva de triglicèrids en el teixit adipós pot resultar en un mal funcionament d'aquest teixit. El teixit adipós, però, no és l'únic teixit afectat; un excés de greix portarà a una acumulació ectòpica d'aquest, per exemple al múscul esquelètic, al cor i al fetge, així com a un augment considerable d'àcids grassos circulants. Totes aquestes alteracions acabaran portant a l'aparició de la síndrome metabòlica i a un augment important del risc de patir malalties com diabetis *mellitus* de tipus 2, malalties cardiovasculars o càncers diversos (Bays, 2011).

Un teixit que pot tenir un paper important en la protecció contra l'obesitat és el teixit adipós marró. El teixit adipós marró és un dels principals teixits consumidors d'energia en els mamífers. L'activació d'aquest teixit porta a un balanç energètic negatiu i, per tant, a la protecció front l'obesitat. A més a més, el manteniment d'aquest teixit requereix del consum constant de glucosa i de greixos, protegint, a la vegada, front a un estat hiperglucídic i hiperlipídic (Cannon and Nedergaard, 2004; Feldmann et al., 2009).

1.2. Organització del teixit adipós

Tots els organismes eucariotes presenten la capacitat d'emmagatzemar calories en forma de triglicèrids (TG). Aquests TG es troben empaquetats dins del citoplasma en el que s'anomenen gotes lipídiques. Els vertebrats, a més a més, presenten un teixit especialitzat en aquesta funció de magatzem de reserves de l'organisme, anomenat teixit adipós.

El principal tipus cel·lular del teixit adipós són els adipòcits, les cèl·lules especialitzades en l'emmagatzemantge dels TG. A part dels adipòcits, dins el teixit adipós hi trobem altres tipus cel·lulars com cèl·lules endotelials, terminals nervioses, cèl·lules fibroblàstiques, preadipòcits, cèl·lules multipotents o cèl·lules del sistema immunitari (Figura 1). A totes aquestes cèl·lules, que també formen part del teixit adipós, se les anomena la fracció de l'estroma vascular (SVF). La SVF del teixit adipós variarà en funció de l'estat d'activació del teixit, així com en resposta a alteracions patològiques (Cawthorn et al., 2012; Rodbell, 1964).

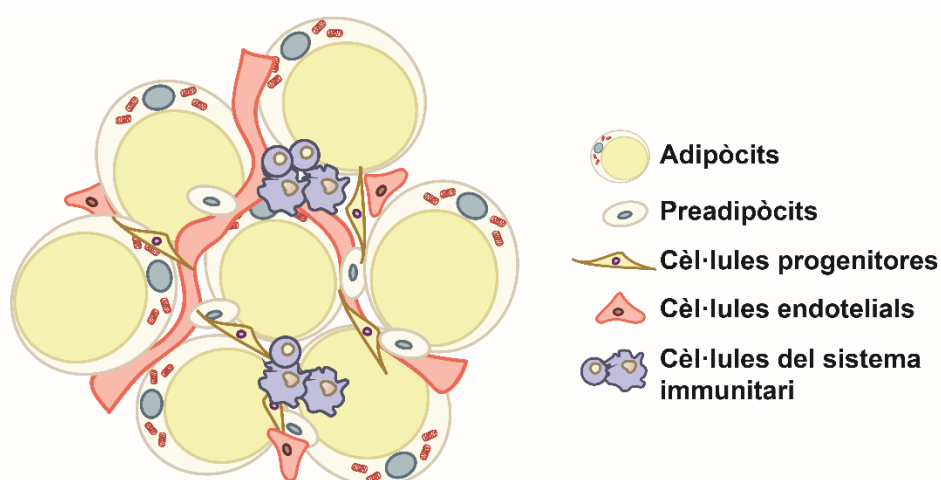


Figura 1. Heterogeneïtat del teixit adipós. Representació dels tipus cel·lulars que formen el teixit adipós; els adipòcits i les cèl·lules que constitueixen la fracció de l'estroma vascular (SVF). Adaptada de Shukla et al., 2015.

Els adipòcits, però, no són l'únic tipus cel·lular amb la capacitat d'emmagatzemar gotes lipídiques; altres tipus cel·lulars, com els hepatòcits o els cardiomiòcits, també poden, temporalment i en situacions concretes, emmagatzemar TG en forma de gotes lipídiques. Ara bé, si aquest fet es perllonga en el temps, a diferència del que passa en els adipòcits, aquestes gotes lipídiques en aquestes cèl·lules no adipocitàries provocaran efectes lipotòxics pel teixit.

1.3. Classificació dels diferents teixits adiposos

Principalment, trobem dos tipus de teixit adipós; el teixit adipós blanc (TAB) i el teixit adipós marró (TAM) (Figura 2). Aquests dos teixits presenten la capacitat d'emmagatzemar TG en gotes lipídiques dins dels seus adipòcits. Tot i això, les seves funcions són més aviat oposades; mentre que el TAB és el reservori d'energia de l'organisme, el TAM consumeix les seves reserves per tal de mantenir la temperatura corporal de l'organisme. Tant el TAB com el TAM són, a més a més, òrgans endocrins que duen a terme funcions de gran importància per a la homeòstasi energètica de l'organisme (Rosen and Spiegelman, 2014). Addicionalment, sota condicions específiques (activació adrenèrgica $\beta 3$) poden aparèixer adipòcits amb fenotip "marró" dins de dipòsits de teixit adipós blanc (Figura 2). Aquests adipòcits s'anomenen adipòcits beix o adipòcits *brite*. Existeix, finalment, un tercer tipus de teixit adipós no tant ben caracteritzat; el teixit adipós del moll de l'os (TAMO) (Li et al., 2018b).

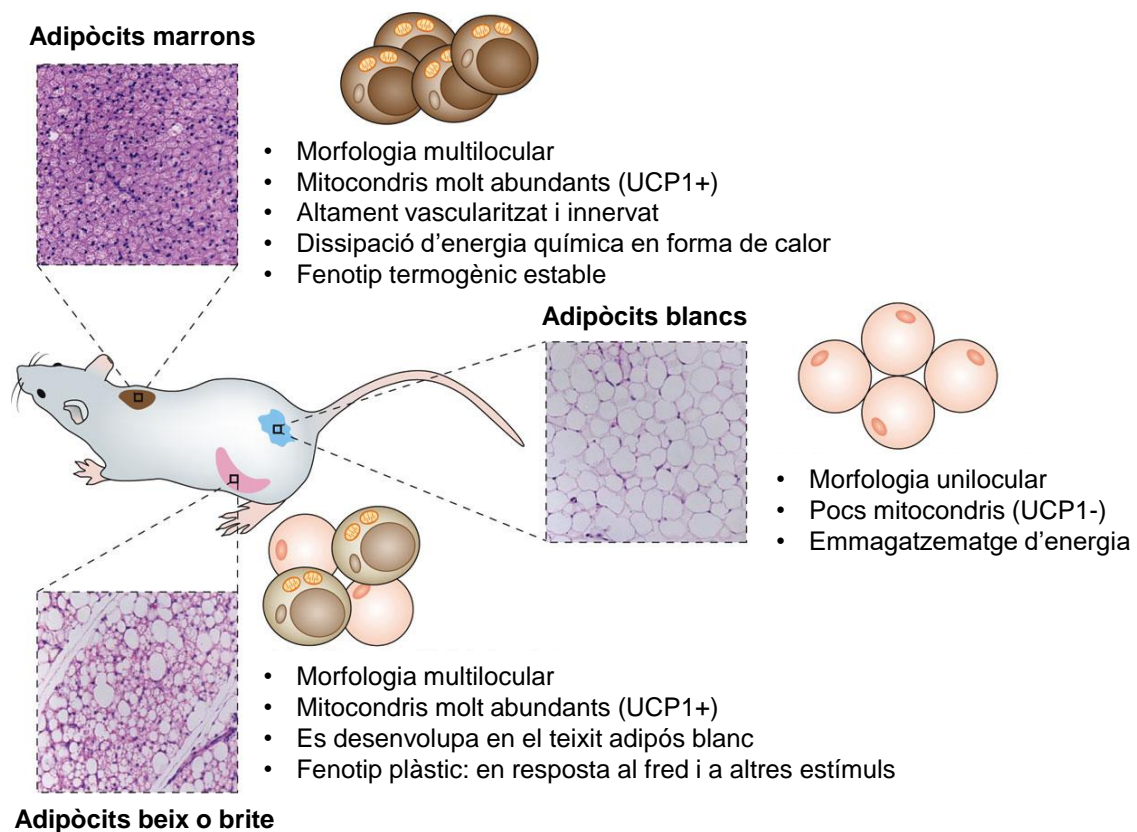


Figura 2. Classificació dels principals tipus d'adipòcits. Principals tipus d'adipòcits amb les seves principals característiques i localització en el ratolí. Modificada de Wang and Seale, 2016.

1.3.1. El teixit adipós blanc

El teixit adipós blanc és el principal lloc d'emmagatzematge d'energia de l'organisme. Les reserves d'energia del teixit adipós blanc es troben en forma de TG i dins d'una gran gota lipídica localitzada al citoplasma de l'adipòcit blanc. Els dipòsits de TAB repartits per l'organisme, a més a més, juguen un paper important en l'aïllament tèrmic i en la protecció mecànica de molts òrgans (Frayn et al., 2003). I, des del descobriment de l'hormona leptina als anys 1990 (Zhang et al., 1994), el teixit adipós ha estat considerat un òrgan endocrí important, capaç de secretar un gran número de pèptids bioactius (adipoquines), i altres metabòlits, regulant, així, el balanç energètic de l'organisme i la homeòstasi de la glucosa.

El principal tipus cel·lular del TAB és l'adipòcit blanc. L'adipòcit blanc presenta una morfologia unilocular, amb una única gota lipídica, que ocupa pràcticament tot el citoplasma de la cèl·lula (Giordano et al., 2014). Aquestes cèl·lules, així, estan especialitzades en l'emmagatzematge dels TG en gotes lipídiques. En funció de les necessitats de l'organisme els adipòcits blancs activaran la lipòlisi per tal d'alliberar àcids grassos a la circulació o activaran, per altra banda, la lipogènesi.

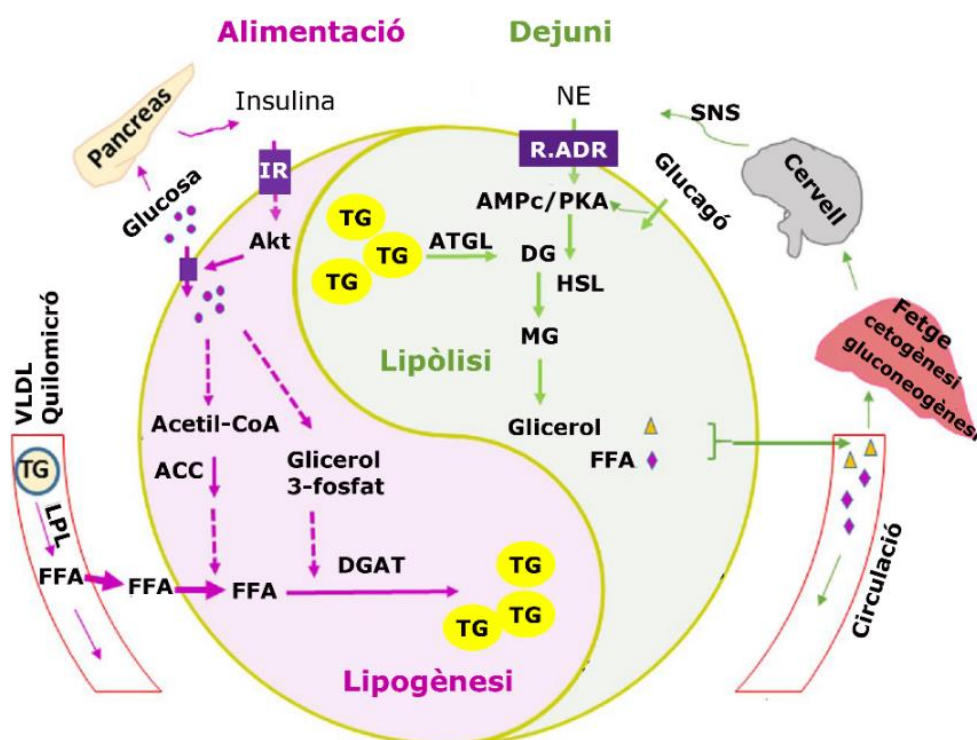


Figura 3. Principals funcions del TAB. Activació de la lipogènesi en resposta a l'entrada d'aliments per tal d'emmagatzemar TG a la gota lipídica i activació, per contra, de la lipòlisi en resposta al dejuni per tal de proporcionar combustible en forma d'àcids grassos lliures (FFA) a altres òrgans i teixits. Adaptada de Luo and Liu, 2016.

En resposta a l'entrada d'aliments, els lípids provinents de la dieta entren a la circulació en forma de quilomicrons (QM). Paral·lelament, el fetge converteix l'excés de carbohidrats en TG i els envia a la circulació en forma de VLDLs (lipoproteïnes de baixa densitat). Gràcies a l'acció de la lipoproteïna lipasa (LPL), aquests lípids entraran a l'adipòcit blanc en forma d'àcids grassos lliures (FFA – *Free fatty acid*). Els adipòcits blancs estan capacitats per dur a terme el procés de lipogènesi, procés en el que els FFA tornen a ser esterificats a TG i són emmagatzemats dins la gota lipídica. A la vegada, la insulina actua en els adipòcits blancs promovent l'entrada de glucosa circulant i estimulando la lipogènesi *de novo* en aquests adipòcits (Figura 3).

Per contra, front a un estat de dejuni, on l'organisme requereix de la mobilització de les reserves energètiques, senyals com el glucagó o la noradrenalina (o norepinefrina, NE) promou la hidròlisi dels TG emmagatzemats en la gota lipídica; procés que es coneix amb el nom de lipòlisi. Els dos enzims clau de la lipòlisi en els adipòcits són l'ATGL (lipasa de triglicèrids adipocitària) i la HSL (lipasa sensible a hormones). Els àcids grassos lliures són enviats a la circulació per ser utilitzats com a combustible per altres òrgans i teixits (Figura 3) (Luo and Liu, 2016).

1.3.2. El teixit adipós marró

El teixit adipós marró va ser descrit anatòmicament per primera vegada l'any 1551 pel suís Konrad Gessner, que el va definir com *nec pinguitudo, nec caro* (ni greix ni múscul) (Gessner, 1551). Molts anys més tard, a l'any 1923, es va descriure el TAM per primera vegada com a glàndula hivernal (Rasmussen, 1923). No és però, fins als anys 1960 que realment es descriu el TAM com el teixit responsable del procés de la termogènesi no associada a tremolor (o termogènesi adaptativa) i, per tant, del manteniment de la temperatura corporal de l'organisme (Cameron and Smith, 1964; Smith and Hock, 1963; Smith and Hoijer, 1962; Smith and Roberts, 1964).

Tot i això, el TAM no guanya rellevància en el camp de la investigació biomèdica l'any 2009 amb el descobriment, a través de les tècniques del PET-scan, de la presència d'aquest i la seva activació front a estímuls de fred en humans adults (Figura 4) (Cypess et al., 2009; van Marken Lichtenbelt et al., 2009; Virtanen et al., 2009). Fins aleshores era cregut que, a diferència dels rosegadors i altres mamífers, els humans presentàvem gran quantitat de TAM al naixement però que aquest s'anava perdent al llarg del desenvolupament fins arribar a ser inexistent en els humans adults.

El principal tipus cel·lular del TAM són els adipòcits marrons, unes cèl·lules amb morfologia multilocular; amb múltiples gotes lipídiques en el seu citoplasma (Giordano et al., 2014). El procés pel qual els adipòcits dissipen l'energia química en forma de calor

s'anomena termogènesi adaptativa o termogènesi no associada a tremolor i, per dur a terme aquest procés requereixen de la presència de la proteïna desacobladora 1 (UCP1), present en els mitocondris. La proteïna UCP1 desacobla la cadena respiratòria permetent la dissipació de l'energia en forma de calor. D'aquesta manera l'energia és utilitzada per generar calor, i no només per formar ATP (adenosina trifosfat). Per poder dur a terme la termogènesi adaptativa, aquests adipòcits presenten un gran nombre de mitocondris i, aquests, estan molt desenvolupats. En aquest teixit, per tant, les gotes lipídiques no tenen la funció de reservori per l'organisme, sinó que serveixen de combustible per mantenir el procés de la termogènesi adaptativa front a un estímul de fred (Cannon and Nedergaard, 2011).

Recentment, s'ha descrit un paper secretor del TAM. En resposta a l'activació termogènica el TAM allibera factors que actuen de manera autocrina i paracrina reforçant aquesta activació, però també factors amb propietats endocrines que modulen processos en altres òrgans i teixits. A aquests factors secretats pel TAM se'ls anomena adipoquines marrons o batoquines (Villarroya et al., 2016).



Figura 4. Activació del TAM en humans adults. Imatges de FDG-PET-CT-scan del mateix humà adult en condicions de termoneutralitat i després de ser exposat a condicions de fred. S'observa com el fred induïx la captació de glucosa en el teixit adipós marró, indicant l'activació de la termogènesi en aquest. També es pot veure la captació de glucosa pel cor. Adaptada de van Marken Lichtenbelt et al., 2009.

1.3.3. Els adipòcits beix/brite

En dipòsits de TAB trobem adipòcits multiloculars i amb expressió de la proteïna UCP1 (capaços de dur a terme el procés de la termogènesi no associada a tremolor) en condicions d'estímul adrenèrgic perllongat en el temps (Young et al., 1984). A aquests adipòcits amb fenotip d'adipòcit marró però amb localització d'adipòcit blanc, se'ls va assignar el nom d'adipòcits beix; color que es forma al barrejar el blanc i el marró (Ishibashi and Seale, 2010) i el nom d'adipòcits brite; de l'acrònim en anglès *brown-in-white* (Petrovic et al., 2010). Al procés pel qual apareixen aquests adipòcits en els dipòsits

de TAB se'l va anomenar amb el nom anglès *browning* (amarronament). En aquesta tesi utilitzarem el terme adipòcit beix.

La distribució dels adipòcits beix en els teixits de TAB no és homogènia, essent principalment els dipòsits de TAB inguinal i retroperitoneal (veurem més endavant que corresponen als teixits de TAB subcutanis) on trobem aquests adipòcits.

També s'explicarà més endavant com aquests adipòcits amb funció d'adipòcit marró comparteixen progenitor amb els adipòcits blancs, en comptes de compartir-lo amb els adipòcits marrons, que es diferencien a partir d'un llinatge diferent (Giralt and Villarroya, 2013).

1.3.4. El teixit adipós del moll de l'os

Un tipus de teixit diferent als anteriors és el teixit adipós del moll de l'os. Aquest teixit adipós, com el seu nom indica, es troba localitzat exclusivament dins del moll de l'os. Els adipòcits d'aquest teixit presenten una morfologia semblant als adipòcits blancs, amb la presència d'una única gota lipídica ocupant pràcticament tot el citoplasma. Encara no es coneix del tot la seva funció, tot i que se li han descrit funcions paracrines, dins de l'os, i funcions endocrines, afectant el metabolisme energètic de l'organisme. Un tret diferenciador d'aquests adipòcits és el fet de no compartir precursors amb els altres tipus d'adipòcits, sinó amb les cèl·lules òssies (els osteoblasts), de manera que al afavorir-se l'adipogènesi en el moll de l'os, es desfavoreix la diferenciació de les cèl·lules òssies (Li et al., 2018b).

1.4. Distribució dels teixits adiposos en l'organisme

El teixit adipós el trobem separat en diferents dipòsits dins de l'animal. Principalment trobem dos tipus de dipòsits; els dipòsits subcutanis, localitzats sota de la pell i els dipòsits viscerals, localitzats, com el seu nom indica, entre les vísceres. Aquests diferents dipòsits adipocitaris actuen de manera independent els uns dels altres (Cinti, 2000). Podem utilitzar classificacions com la que es mostra a continuació per tal d'identificar els principals dipòsits de teixit adipós.

1.4.1. Dipòsits de teixit adipós blanc en ratolins

Dipòsits de TAB subcutanis:

- **Posterior subcutani:** dipòsit que es troba situat a la zona de la pelvis i que s'estén en direcció ventral cap a les extremitats posteriors. Esta unit a la capa dèrmica. El podem dividir en: dorsolumbar, inguinal i glútia.
- **Dorsal subcutani:** dipòsit localitzat sobre el dipòsit interescapular de TAM. Els dos dipòsits es troben intrínsecament units.
- **Anterior subcutani:** dipòsit ubicat entre la pell i les fàscies posteriors dels músculs de les extremitats davanteres.

Dipòsits de TAB visceral:

- **Perigonadal:** El trobem envoltant les gònades. Rep el nom de epididimal en els mascles i de periovàric en les femelles.
- **Retroperitoneal:** El trobem unit a la part dorsal de l'esquena i es troba encapsulat per una fina membrana que el separa del ronyó i del dipòsit de TAM perirenal.
- **Cardíac:** El trobem envoltant el cor des del ventricle dret fins a l'àpex. Acostuma a tenir poc gruix.
- **Mesentèric:** El trobem envoltant els intestins, en el mesenteri.
- **Omental:** El trobem a la cavitat abdominal, sobre la superfície de l'estómac. Sol tenir poc gruix.

1.4.2. Dipòsits de teixit adipós marró en ratolins

- **Interescapular:** És un dipòsit bilobulat i simètric, que trobem ubicat sobre les escàpules. És el dipòsit de TAM més gran.
- **Cervical:** El trobem ubicat a la zona profunda del coll, envoltat per musculatura.
- **Subescapular:** El trobem situat sota les escàpules i entre la musculatura de l'esquena. També s'anomena dipòsit axil·lar.
- **Mediastinal:** També s'anomena dipòsit periaòrtic, ja que es troba ubicat a la zona del mediastí i la major part d'aquest dipòsit envolta l'artèria aorta.
- **Perirenal:** El trobem situat envoltant gran part de l'hil renal, en contacte amb l'artèria i la vena renals i amb l'úter.

En el cas dels humans aquesta distribució dels dipòsits de teixit adipós varia lleugerament, en la figura 5 trobem la localització dels principals dipòsits tant en el cas dels ratolins com en el cas dels humans. En el cas dels humans, la distribució dels dipòsits de teixit adipós també pot variar en funció del gènere. En situació de sobrepès, les dones mostren principalment un engrandiment del teixit adipós blanc subcutani, que porta al que

s'anomena cos en forma de pera, i que presenta un risc metabòlic baix. Per altra banda, els homes en condicions de sobrepès acumulen més teixit adipós blanc visceral, modulant el seu cos en el que s'anomena forma de poma, i presentant un major risc per la síndrome metabòlica (Gesta et al., 2007)

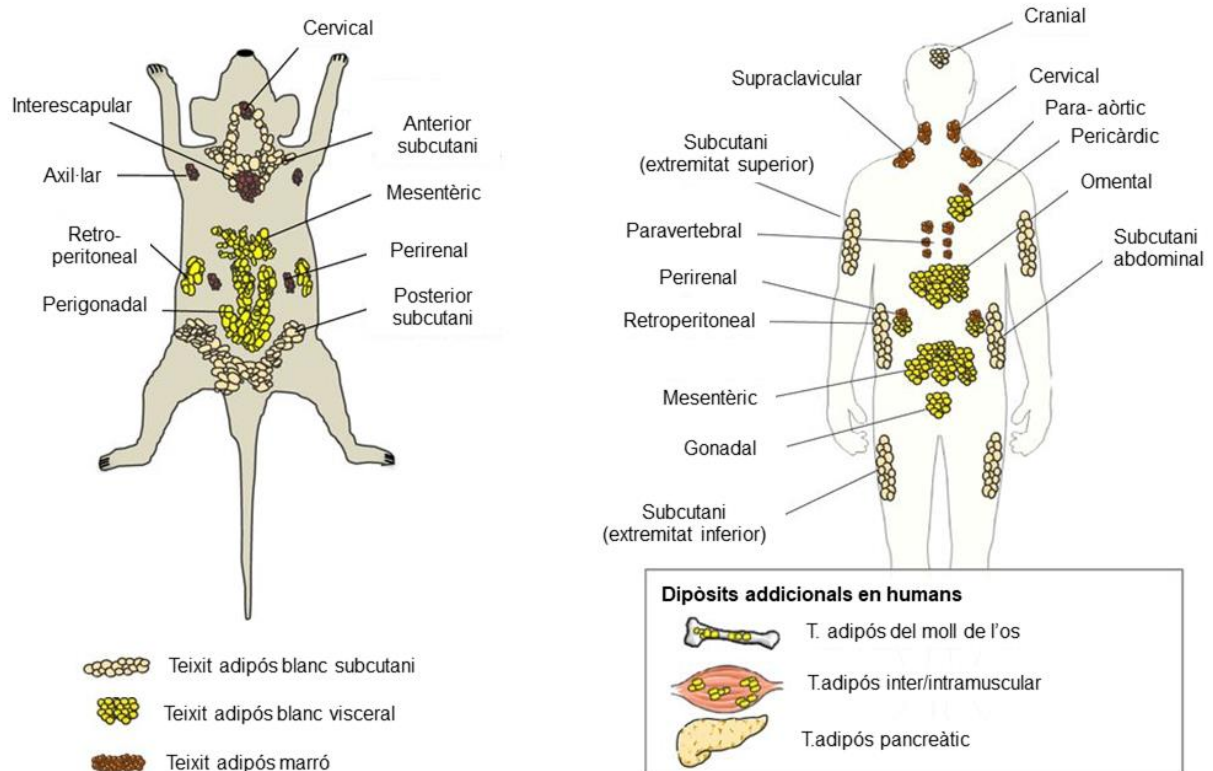


Figura 5. Principals dipòsits de teixit adipós en ratolins i en humans. Esquema representatiu dels diferents dipòsits de teixit adipós blanc i de teixit adipós marró presents tant en els ratolins com en els humans. Adaptada de Schoettl et al., 2018.

1.5. EL teixit adipós marró

1.5.1. Funció principal: La termogènesi adaptativa

Els mamífers som animals endotèrms, és a dir, animals capacitats per mantenir més o menys constant la temperatura corporal front a canvis en la temperatura ambiental. A més a més, també tenim un major aïllament gràcies als dipòsits de teixit adipós. La temperatura de termoneutralitat és aquella temperatura a la qual no necessitem res més que la taxa metabòlica basal per tal de mantenir la temperatura corporal. La temperatura de termoneutralitat varia en funció de l'espècie. En ratolins, per exemple, es troba al voltant dels 30°C (Cannon and Nedergaard, 2011). Un cop sortim de la zona de termoneutralitat necessitem mecanismes per mantenir la temperatura corporal. Primerament, la mantenim a través de mecanismes com la vasoconstricció o simplement

un canvi de postura (per tal de disminuir la superfície de contacte amb el fred). Si la temperatura ambiental segueix baixant, activem la termogènesi per tremolor; contracció involuntària del múscul esquelètic que ens proporciona calor (Haman, 2006). Aquest procés, però, no es pot mantenir de manera sostinguda en el temps. Finalment, doncs, si la temperatura segueix baixant, s'activa el que es coneix com a termogènesi no associada a tremolor o termogènesi adaptativa.

Amb els experiments duts a terme als anys 1960 per R.E. Smith es posava de manifest que el teixit responsable d'aquest procés, anomenat termogènesi adaptativa, era el teixit adipós marró (Cameron and Smith, 1964; Smith and Hock, 1963; Smith and Hoijer, 1962; Smith and Roberts, 1964). Més endavant, als anys 1970 es descrivia la proteïna mitocondrial UCP1 (abans anomenada termogenina o, simplement, UCP) com la principal responsable d'aquest procés (Nicholls et al., 1978).

El TAM, així, juga un paper important en l'organisme produint calor per tal de mantenir la temperatura corporal de l'organisme. Alhora, juga un paper important en la regulació de la despesa energètica gràcies a l'elevada capacitat oxidativa necessària per mantenir activa la producció de calor. El fet de ser un gran consumidor de glucosa i lípids, provinents tant de l'adipòcit marró, com captats de la circulació, li confereix un caràcter antiobesogènic i antidiabètic (Townsend and Tseng, 2014). Per contra, sota condicions d'obesitat, el TAM presenta la seva activitat considerablement reduïda (van Marken Lichtenbelt et al., 2009).

Desacoblament de la cadena de transport d'electrons: Funció d'UCP1

El metabolisme oxidatiu de les cèl·lules convergeix en la cadena respiratòria o cadena de transport d'electrons, localitzada a la membrana interna dels mitocondris. Els electrons provinents dels NADH del cicle de Krebs entren a la cadena de transport d'electrons on, a través dels seus diferents complexos (de I' al V), s'acaben alliberant protons a l'espai intermembrana mitocondrial, generant un gradient de protons. En una cèl·lula que no expressa la proteïna UCP1 aquests protons entren a la matriu mitocondrial a través de la ATP sintasa (o complex V) que, a la vegada, genera una molècula d'ATP. L'acumulació de molècules d'ATP actua de senyal inhibidora per tal de frenar el catabolisme mitocondrial.

Els adipòcits marrons i els adipòcits beix es caracteritzen per expressar la proteïna UCP1 en les membranes internes dels seus mitocondris. En aquestes cèl·lules, el gradient de protons generat per la cadena de transport d'electrons és dissipat cap a la matriu mitocondrial a través del transportador de protons UCP1 (desacoblament de la cadena), en aquest cas sense generació d'ATP associada (Figura 6). Al no haver generació d'ATP associada a l'entrada dels protons no es produeix la inhibició del catabolisme oxidatiu.

Les ineficiències resultants de totes les reaccions implicades són les responsables de la generació de calor (Nicholls and Locke, 1984). Per tal de poder transmetre la calor generada, el TAM és un teixit àmpliament vascularitzat.

Tot i l'existència d'altres proteïnes UCP (UCP2, UCP3, UCP4 i UCP5), UCP1 és la única descrita com a responsable del desacoblament de la cadena de transport d'electrons en els adipòcits marrons i beix (Golozoubova et al., 2001; Krauss et al., 2005; Nedergaard et al., 2001)

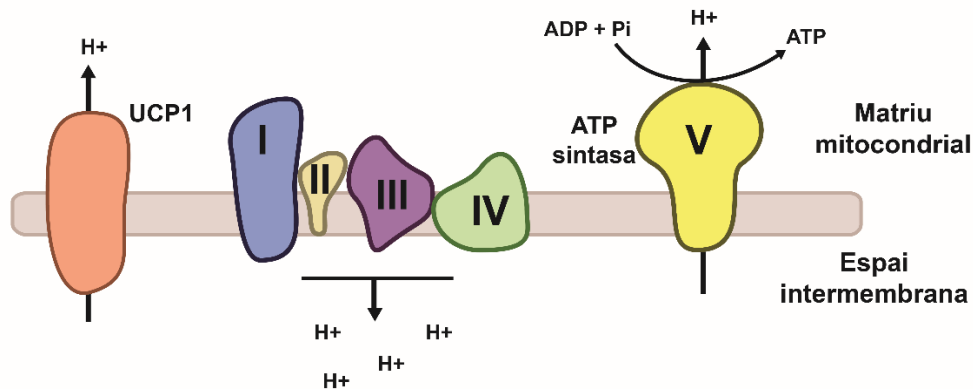


Figura 6. Elements de la cadena de transport d'electrons en els adipòcits marrons i beix. En les cèl·lules sense expressió d'UCP1, el gradient de protons generat pels diferents complexes de la cadena és dissipat a l'interior de la matriu mitocondrial a través de la ATP sintasa; aquesta entrada va acompanyada de la formació de molècules d'ATP. UCP1, per contra, desacobla la cadena de transport d'electrons i el gradient de protons és dissipat a través d'aquesta generant calor i no ATP.

Regulació noradrenèrgica de la termogènesi adaptativa

La disminució de la temperatura ambiental, és a dir el fred, és detectat per les neurones termoreceptores perifèriques, localitzades a la pell. Aquestes neurones detecten els canvis de la temperatura ambiental a través d'uns canals catiónics presents a les seves membranes; un d'aquests canals és el TRPM8 (*Transient receptor potential cation channel subfamily M member 8*). Aquest senyal arriba a l'hipotàlem, concretament a l'àrea preòptica (APOH), on es coordina la resposta (Morrison et al., 2014).

El TAM és un teixit àmpliament innervat. La senyal coordinada a l'hipotàlem arriba a les terminals nervioses simpàtiques que innerven aquest teixit. En la via clàssica d'activació del TAM, aquestes terminals nervioses alliberen la catecolamina noradrenalina (NA), també anomenada norepinefrina (NE). La NA és la principal inductora de l'activació de la termogènesi en el TAM, a través de la seva unió amb el receptor adrenèrgic β_3 .

En les membranes dels adipòcits marrons trobem tant receptors adrenèrgics α com receptors adrenèrgics β . Dels 3 receptors adrenèrgics β existents, el receptor adrenèrgic β_3 és el majoritari i el més fortament implicat en l'activació de la termogènesi en els adipòcits marrons madurs. El receptor adrenèrgic β_3 és un receptor transmembrana acoblat a proteïnes G, normalment a proteïnes $G_s\alpha$ s tot i que també el podem trobar acoblat a proteïnes G_i (del tipus inhibitori) (Bourová et al., 2000). El receptor adrenèrgic β_1 , per altra banda, també el trobem present en els adipòcits marrons madurs, tot i que és més abundant en els preadipòcits, on està implicat en la proliferació i, per tant, en la hiperplàsia del TAM en resposta a la NA. Finalment, el receptor adrenèrgic β_2 no es troba present en els adipòcits marrons madurs (Bronnikov et al., 1999; Cannon and Nedergaard, 2004).

La unió de la NA al receptor adrenèrgic β_3 dels adipòcits marrons desencadena l'activació de l'enzim adenilat ciclasa, enzim que catalitza la ciclació de l'adenosina mono fosfat (AMP) augmentant els nivells intracel·lulars del segon missatger AMP cíclic (AMPc). En els adipòcits marrons madurs, aquest augment dels nivells intracel·lulars d'AMPc porta, principalment, a l'activació de l'enzim proteïna cinasa A (PKA), proteïna cinasa dependent d'AMPc. Dos dels substrats més importants d'aquesta cinasa són el factor de transcripció de resposta a la unió d'AMPc (CREB) i el factor de transcripció activador 2 (ATF2). Aquests factors de transcripció desencadenen l'activació de la transcripció del programa termogènic, dins del qual trobem gens com *UCP1*, la tirosina 5'-desiodasa de tipus 2 (*DIO2*) o el coactivador de $\text{ppar}\gamma$ 1- α (*PGC1\alpha*). Un altre dels substrats de la PKA és la proteïna cinasa activada per mitogens p38 (p38 MAPK). La p38 MAPK activa és també un element clau de l'activació de la termogènesi, fosforila el factor ATF2 i, a més a més, fosforila el coactivador *PGC1\alpha*, activant-los (Cao et al., 2001).

PGC1\alpha és un regulador clau de la biogènesi mitocondrial que també juga un paper rellevant en l'activació de la termogènesi; regula la transcripció de gens termogènics a través de la interacció amb factors de transcripció com *PPAR\alpha* (*peroxisome proliferator activated-receptor alpha*), *PPAR\gamma* (*peroxisome proliferator activated-receptor gamma*) o el receptor d'hormones tiroïdals (TR) (Puigserver et al., 1998). *PGC1\alpha* es troba activat sota estímul adrenèrgic; el factor ATF2 regula la seva transcripció i la p38 MAPK, la seva activació.

Paral·lelament, la PKA fosforila la HSL així com proteïnes de les gotes lipídiques, com les perilipines, provocant la hidròlisi dels triglicèrids emmagatzemats en aquestes gotes i activant, per tant, la lipòlisi. Aquests àcids grassos lliures són utilitzats com a substrat per tal de sustentar la termogènesi (Figura 7) (Kajimura and Saito, 2014).

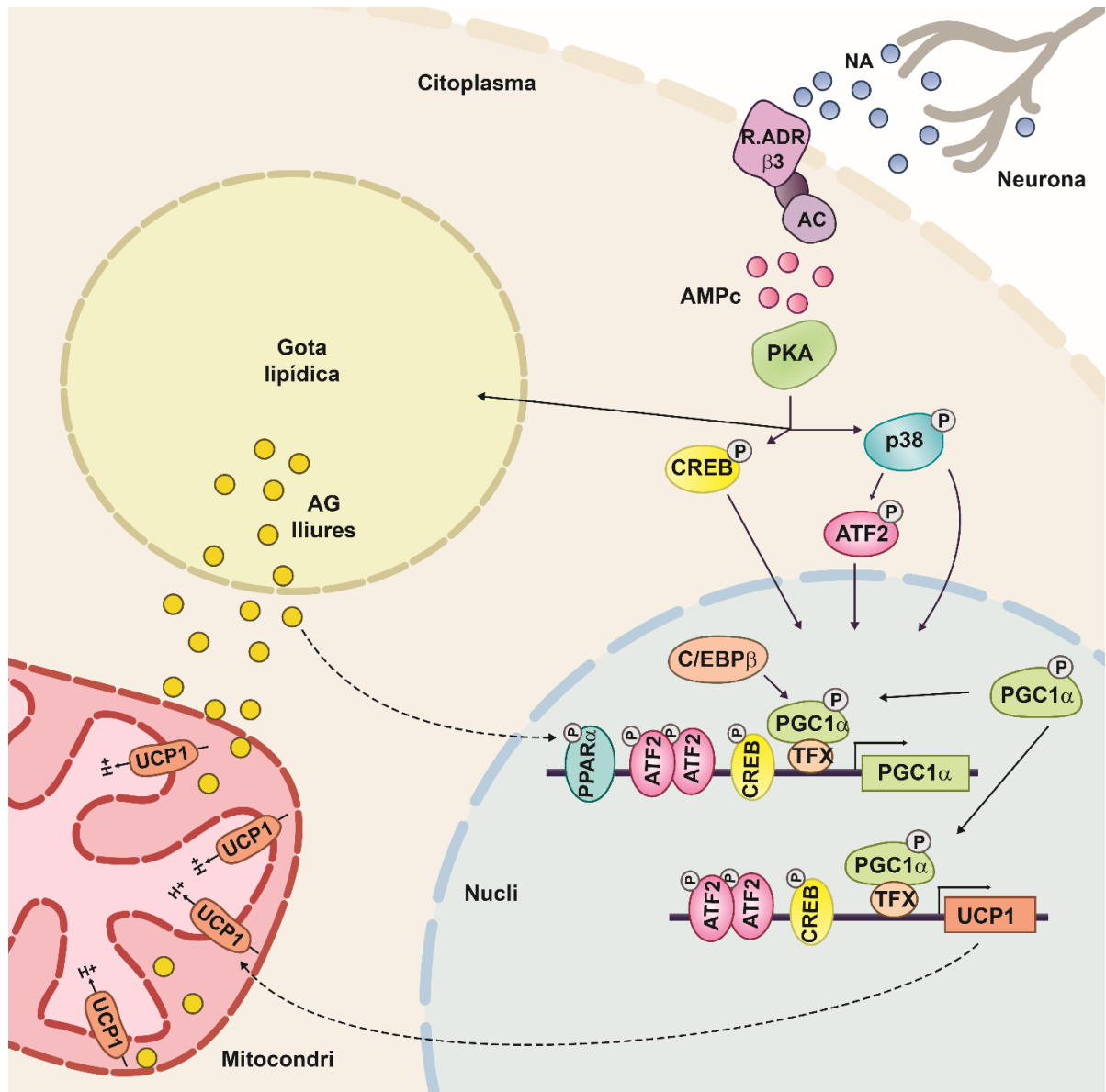


Figura 7. Activació clàssica de la termogènesi adaptativa en el TAM. Esquema de la cascada de senyalització de la termogènesi. Unió de la NA al receptor adrenèrgic β_3 amb la subseqüent activació de la PKA i de la p38MAPK i, activació final de la transcripció dels gens termogènics. Per altra banda, activació de l'alliberació d'àcids grassos de les gotes lipídiques a través de l'activació de la HSL i de les perilipines, per la PKA. Finalment, translocació d'UCP1 al mitocondri i dissipació del gradient de protons a través d'aquest. Adaptada de Harms and Seale, 2013.

Regulació no noradrenèrgica de la termogènesi adaptativa i del *browning*

La noradrenalina, tot i ser l'activador més important de la termogènesi adaptativa, no n'és l'únic. S'han descrit altres activadors d'aquest procés que actuen per vies independents del receptor adrenèrgic β_3 (Harms and Seale, 2013; Ludwig et al., 2018; Schulz and Tseng, 2013). Alguns d'aquests es descriuen a continuació.

- **Hormones tiroïdals:** Els adipòcits marrons capten la tiroxina (T4) i, gràcies a la presència de l'enzim DIO2 en aquestes cèl·lules, poden transformar la T4 en triiodotironina (T3). La T3 té efectes intracel·lulars dins dels adipòcits marrons activant la termogènesi; activa la transcripció del gen *UCP1* a través de la seva unió al receptor d'hormones tiroïdals (Guerra et al., 1996; Villarroya and Vidal-Puig, 2013). Però, a més a més, les hormones tiroïdals també activen la termogènesi en el TAM de forma indirecta, activant la proteïna cinasa activada per AMP (AMPK) en l'hipotàlem (López et al., 2010).
- **Àcid retinoic:** L'àcid retinoic, derivat de la vitamina A, és un potent inductor de la termogènesi; activa la transcripció del gen d'*UCP1*, així com la diferenciació adipocitària. A més a més, en resposta a la NE augmenta l'expressió de l'RBP4 (proteïna d'unió de retinol-4) per tal d'augmentar la captació de retinol (Rosell et al., 2012).
- **FGF21 (factor de creixement fibroblàstic 21) :** L'FGF21 pot actuar tant com a factor endocrí (provinent del fetge) com com a factor paracrí/autocrí (provinent dels mateixos adipòcits). En els adipòcits marrons, FGF21 activa la termogènesi unint-se al seu receptor FGFR1 i al co-receptor β -Klotho. FGF21 promou l'activació de PGC1 α (Hondares et al., 2011). En el teixit adipós blanc, FGF21 promou el *browning* (Fisher et al., 2012).
- **Àcids biliars:** En resposta al fred, s'afavoreix la conversió de colesterol a àcids biliars en el fetge. Aquest fet comporta un augment dels àcids biliars circulants així com un augment de l'excreció via fecal d'aquests. Els àcids biliars circulants, via el receptor TGR5 (receptor d'àcids biliars acoblat a proteïnes G) i la proteïna DIO2, promouen la termogènesi en els adipòcits marrons (Watanabe et al., 2006; Worthmann et al., 2017).
- **BMP8b (Bone morphogenic protein 8b):** Tot i que varis membres de la subfamília dels BMP estan implicats en la diferenciació en el context del teixit adipós, BMP8b, expressat en els adipòcits marrons madurs i en el sistema nerviós central, està implicat en la regulació de la termogènesi i el balanç energètic. Pot actuar directament sobre els adipòcits marrons augmentant la resposta de l'estímul adrenèrgic o activant la termogènesi a nivell central, a l'hipotàlem (Whittle et al., 2012).

- **Irisina:** En resposta a l'exercici físic trobem l'activació de PGC1 α en el múscul esquelètic. En aquestes condicions, una de les dianes de PGC1 α és el factor Fndc5. L'activació d'aquest factor porta a la seva modificació per tal de ser alliberat de la membrana i entrar a la circulació en la seva forma madura, anomenada irisina. Aquesta citocina arriba als dipòsits de TAB on estimula la formació d'adipòcits beix; indueix el *browning* (Boström et al., 2012).
- **Àcid β -aminoisobutíric (BAIBA):** Aquest metabòlic també augmenta en resposta a l'exercici físic en el múscul esquelètic, d'on és secretat a la circulació. En aquest cas la secreció de BAIBA també depèn de PGC1 α . Actua com a factor endocrí en el teixit adipós blanc promovent el procés del *browning*, a través de PPAR α (Roberts et al., 2014).
- **METRNL (*Meteorin-like*):** La secreció d'aquesta proteïna per part del múscul esquelètic i dels adipòcits blancs es troba induïda amb l'exercici físic i el fred, respectivament. METRNL actua en els eosinòfils del sistema immunitari estimulant-ne la secreció de la interleucina 4 (IL-4). La IL-4 promou l'aparició de macròfags activats a fenotip M2 dins dels TAB. Per últim, aquests macròfags M2 alliberen factors inductors del programa termogènic en els adipòcits blancs, promovent el *browning* (Rao et al., 2014).
- **Pèptids natriurètics cardíacs (NPs):** El pèptid natriurètic auricular (ANP) i el pèptid natriurètic del tipus B (BNP) són hormones secretades pels cardiomiòcits i relacionades amb la regulació de la pressió sanguínia. En el teixit adipós, l'ANP i el BNP senyalitzen a través del seu receptor NPRA, present en la membrana d'aquests (Sarzani et al., 1996). Els pèptids NP activen tant la termogènesi en el TAM com el *browning* en el TAB a través de l'activació de la cascada de senyalització monofosfat de guanina cíclic (cGMP)-proteïna cinasa dependent de cGMP (PKG)-p38 MAPK, on convergeix amb la via clàssica d'activació del TAM (Bordicchia et al., 2012; Shi and Collins, 2017).

1.5.2. Funció com a òrgan endocrí

Està àmpliament acceptat que el teixit adipós blanc no només actua com a reservori d'energia per l'organisme, sinó que també compleix una funció endocrina molt important, sent capaç d'enviar senyals a altres òrgans i teixits.

El teixit adipós marró, per contra, ha estat considerat fins recentment només com un lloc de consum metabòlic capaç de dissipar l'energia en forma de calor. Ara bé, com a

conseqüència de l'activació del TAM s'observen adaptacions metabòliques sistèmiques, com ara la reducció de la glucèmia i/o la sensibilització a la insulina. Es creu que aquests són esdeveniments importants associats a la funció termogènica del TAM.

Per tant, era lògic plantejar que, de la mateixa manera que el teixit adipós blanc, el teixit adipós marró pogués actuar com a òrgan endocrí secretant molècules que permetin a aquest teixit comunicar-se amb altres cèl·lules i òrgans perifèrics per tal de coordinar la resposta termogènica adaptativa circulant (Villarroya et al., 2016). Molt pocs d'aquests factors, anomenats "batoquines" o adipocines marrons, han estat descrits fins l'actualitat, essent uns dels principals la interleucina-6 (IL-6) (Burýšek and Houšťek, 1997) i el factor endocrí FGF21 (Chartoumpakis et al., 2011; Fisher et al., 2012; Hondares et al., 2011) (Figura 8).

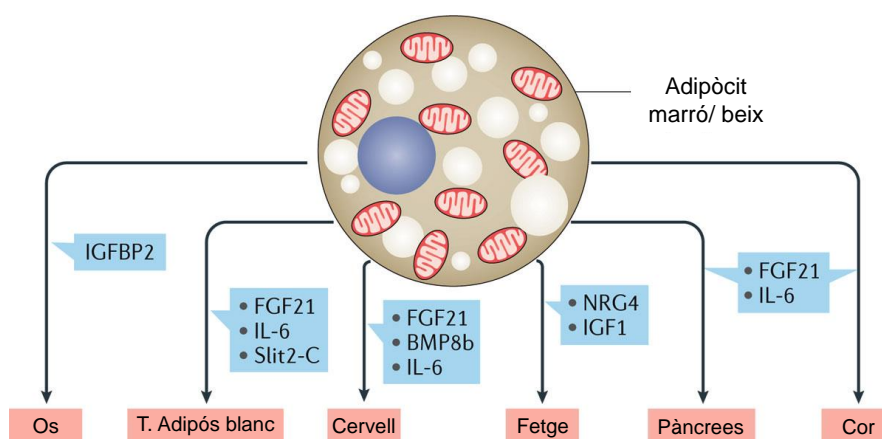


Figura 8. Factors endocrins secretats pels adipòcits marrons i beix. Alguns de factors secretats pels adipòcits marrons i beix i els òrgans i teixits en els quals actuen. Alguns d'aquests factors, com FGF21, també poden tenir efectes autocrins/paracrins en el TAM. Adaptada de Villarroya et al., 2016.

Una part important d'aquesta tesi s'ha centrat en la identificació de la proteïna GDF15 (*growth differentiation factor 15*) com una batoquina produïda i alliberada pels adipòcits marrons en resposta a l'estímul adrenèrgic.

1.5.3. Diferenciació dels adipòcits marrons

El teixit adipós marró difereix en el moment del desenvolupament respecte al teixit adipós blanc, essent el TAM el primer de desenvolupar-se. El TAM es desenvolupa durant el període fetal i s'activa al moment del naixement, moment en el que l'animal pateix un gran estrès tèrmic; passa de la temperatura corporal de la mare a la temperatura exterior (Pope et al., 2014; Symonds et al., 2015). Per altra banda, el desenvolupament del teixit

adipós blanc és més tardà i seguirà desenvolupant-se després del naixement, en resposta a la creixent disponibilitat de nutrients (Cristancho and Lazar, 2011).

Tot i presentar diferències tant en morfologia i funció com en el moment del desenvolupament, els diferents tipus d'adipòcits, juntament amb els osteoblasts, els miòcits i els condrocits, s'originen tots a nivell embrionari i, a partir de cèl·lules mare mesenquimals (MSCs). El procés pel qual aquestes cèl·lules mare mesenquimals acaben donant lloc als adipòcits s'anomena adipogènesi. El procés d'adipogènesi el podem dividir en dues fases diferenciades: La determinació del llinatge adipocitari i la diferenciació terminal (Cristancho and Lazar, 2011). Durant la fase de determinació del llinatge adipocitari es formaran els preadipòcits, cèl·lules precursors destinades exclusivament a esdevenir adipòcits. Finalment, en la diferenciació terminal, els preadipòcits seran diferenciats per donar lloc a adipòcits madurs funcionals.

Determinació

Així, tant els adipòcits marrons com els adipòcits blancs s'originen de cèl·lules mare mesenquimals, ara bé, el llinatge del qual s'originen aquests dos tipus cel·lulars no és el mateix. Generalment, es considera que els adipòcits marrons deriven de cèl·lules precursors amb expressió del factor miogènic 5 (Myf5) i d'altres marcadors, com la proteïna *paired-box 7* (Pax7). Aquest llinatge és el mateix del qual deriven les cèl·lules musculars; en el cas dels adipòcits marrons Pax7 tindrà, predominantment, una expressió primerenca, mentre que en les cèl·lules musculars aquesta expressió serà, en principi, més tardana. Per altra banda, es considera que els adipòcits blancs provenen de cèl·lules precursors sense expressió dels marcadors Myf5 o Pax7 (Wang and Seale, 2016) (Figura 9). Actualment, aquest concepte està canviant degut a la identificació de preadipòcits marrons clàssics sense expressió de Myf5 (Myf5⁻) i de preadipòcits blancs amb expressió de Myf5 (Myf5⁺) (Seale et al., 2008). Sembla ser que l'expressió o la falta d'expressió de Myf5 ve definit més aviat per la ubicació del dipòsit adipós que pel tipus d'aquest. Així, a la zona dorsoanterior trobarem principalment preadipòcits Myf5⁺, mentre que a la zona ventral-posterior els trobarem Myf5⁻ (Sanchez-Gurmaches and Guertin, 2014).

La diferenciació de les cèl·lules precursors a preadipòcits té lloc gràcies a senyals tant mecàniques (contactes cèl·lula-cèl·lula o composició i rigidesa de la matriu extracel·lular) com químiques (principalment membres de la família *wingless and int1*, Wnt, i de la família *transformin growth factor beta*, TGFβ). Aquestes senyals provoquen una aturada de la proliferació de les cèl·lules precursors i la diferenciació d'aquestes fins a preadipòcits. Tot i que generalment la combinatòria d'aquestes senyals pot induir la diferenciació tant de preadipòcits blancs com marrons alguns membres concrets de la família TGFβ promouen la diferenciació dels adipòcits blancs (*bone morphogenic protein 2*, BMP2)

(Sottile and Seuwen, 2000) i altres promouen la dels adipòcits marrons (BMP7 i BMP9) (Kuo et al., 2014; Tseng et al., 2008).

Una altra proteïna capaç d'influenciar el procés de determinació dels adipòcits és la proteïna amb dit de zinc 423 (ZFP423), que actua amplificant la senyal dels BMPs i induint l'expressió del factor PPAR γ , factor de transcripció clau del procés d'adipogènesi, tant pels adipòcits blancs com pels adipòcits marrons (Gupta et al., 2010).

La NA, per altra banda, participa durant tot el procés d'adipogènesi dels adipòcits marrons. En les cèl·lules precursors i en els preadipòcits marrons actua a través dels receptors adrenèrgics β 1 induint la proliferació. En els preadipòcits ja determinats contribueix a augmentar els nivells intracel·lulars d'AMPc (clau per l'activitat de la proteïna d'unió a seqüència CCAAT i a potenciadors beta, C/EBP β). Finalment, en l'adipòcit madur actua a través dels receptors adrenèrgics β 3 activant el procés de la termogènesi (CANNON and NEDERGAARD, 2004).

Diferenciació terminal

Entre els factors comuns en la diferenciació dels adipòcits blancs i dels adipòcits marrons trobem els factors C/EBP β i PPAR γ . Els dos tipus d'adipòcits necessiten l'expressió d'aquests factors per tal de diferenciar-se a adipòcits madurs, així com la continua expressió d'aquests durant la vida de l'adipòcit madur per tal de mantenir el fenotip. En el cas dels adipòcits marrons aquests dos factors interaccionen amb PRDM16 (factor amb dominis PR 16) (Kajimura et al., 2009). El factor PRDM16, juntament amb el coactivador PGC1 α , són dos factor clau per la diferenciació dels adipòcits marrons i per l'adquisició del fenotip termogènic.

El factor PRDM16, gràcies a la unió amb la histona metiltransferasa EHMT1, és capaç de reprimir la diferenciació a cèl·lula muscular, afavorint la diferenciació a adipòcit marró. De fet, l'absència de PRDM16 en preadipòcits en cultiu promou la diferenciació a cèl·lules mioblàstiques (Seale et al., 2008). Un altre factor capaç d'interaccionar amb PRDM16, la proteïna amb dit de zinc 516 (ZFP516), també és necessari per la repressió del fenotip muscular. En models *in vivo*, però, l'absència de PRDM16 no té efectes importants en el desenvolupament del TAM, ja que esta compensat per altres proteïnes relacionades, com PRDM3. PRDM16, a més a més, actua reprimint els gens específics d'adipòcit blanc en els adipòcits marrons madurs, representant un factor clau no només durant el procés d'adipogènesi sinó també pel manteniment del fenotip termogènic (Figura 9) (Harms et al., 2014).

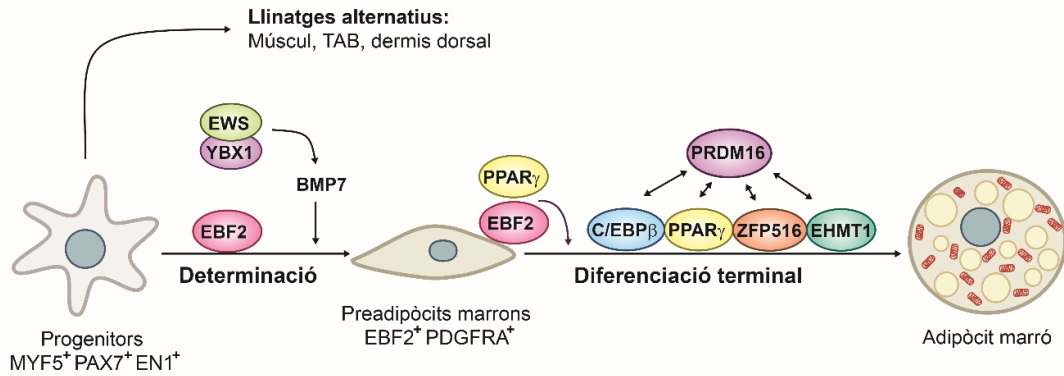


Figura 9. Diferenciació dels adipòcits marrons. Durant el desenvolupament embrionari del TAM, les cèl·lules precursors esdevenen preadipòcits marrons per, després, diferenciar-se a adipòcits marrons madurs. Trobem diversos factors de transcripció i vies de senyalització implicades en aquests processos. El factor EBF2 marca el procés de determinació, EWS interacciona amb YBX1 per regular la transcripció de BMP7, factor que promou la diferenciació del TAM. La diferenciació a adipòcit madur és conduïda pel factor PRDM16 mitjançant la interacció amb C/EBP β , PPAR γ , ZFP516 i amb EHMT1. Adaptada de Wang and Seale, 2016.

Diferenciació dels adipòcits beix

Avui en dia el procés de diferenciació dels adipòcits beix dins dels dipòsits de TAB encara és un tema controvertit. Actualment, trobem dues teories acceptades que, si bé certs investigadors proposen l'una o la altra com a vàlides, el més probable sigui que ens trobem davant de la combinació de les dues, segons les necessitats de l'organisme i del teixit concret en cada situació. A aquestes teories els hi direm la teoria de la diferenciació *de novo* i la teoria de la transdiferenciació (Figura 10).

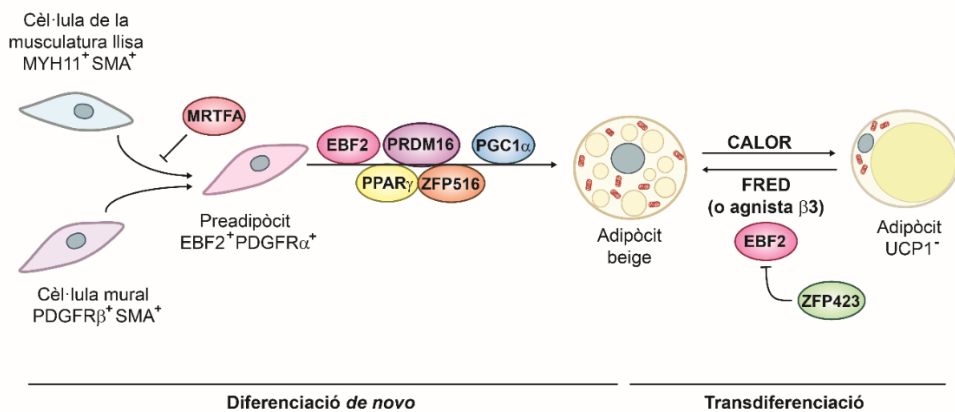


Figura 10. Diferenciació dels adipòcits beix. Poblacions de precursors MYH11 $^{+}$ SMA $^{+}$ i poblacions PDGFR β^{+} SMA $^{+}$ residents al TAB i sota un estímul de fred perllongat en el temps poden diferenciar-se en adipòcits beix, seguint la teoria de diferenciació *de novo*. Per altra banda, adipòcits blancs madurs poden transdiferenciar-se en adipòcits beix, també sota estímul adrenèrgic. Adaptada de Wang and Seale, 2016.

En la teoria de la diferenciació *de novo*, els adipòcits beix es diferencien a partir de precursors residents en el teixit adipós blanc. Diversos estudis proposen una relació d'aquests precursors amb el llinatge de musculatura llisa (Long et al., 2014). En aquests precursors els factors de transcripció EBF2 (*early B cell factor 2*), PRDM16, PPAR γ , ZFP516 i PGC1 α promouen la diferenciació a adipòcits beix madurs (amb fenotip termogènic). El factor de transcripció MRTFA (*Myocardin-related transcription factor A*) reprimeix la diferenciació a adipòcit beix en els precursors relacionats amb musculatura llisa (McDonald et al., 2015).

La teoria de la transdiferenciació, per altra banda, proposa els adipòcits blancs madurs com les cèl·lules que donen lloc als adipòcits beix. Segons aquesta teoria, els adipòcits blancs quiescents, en resposta a un estímul adrenèrgic, són capaços de reprogramar-se a nivell genètic o epigenètic per tal d'esdevenir adipòcits beix, amb expressió del gen *UCP1*, així com de tota la maquinària termogènica (Barbatelli et al., 2010). De la mateixa manera, front a l'augment de la temperatura els adipòcits beix tornarien a adquirir un fenotip més aviat semblant al dels adipòcits blancs (Figura 10).

Aquesta teoria de la transdiferenciació ha estat demostrada en un altre tipus d'adipòcits, els adipòcits roses. Durant l'embaràs, alguns dels adipòcits blancs que formen la glàndula mamària pateixen transdiferenciació per donar lloc a cèl·lules productores de llet (Morrone et al., 2004).

1.5.4. Els macròfags del teixit adipós marró

La infiltració immunitària als teixits adiposos esta àmpliament descrita en el context del teixit adipós blanc, on juga un paper important en l'obesitat, la diabetis de tipus 2 i la síndrome metabòlica. En el cas del teixit adipós marró, aquesta, fins fa uns anys, no havia estat descrita. Recordem que el TAM presenta interès biomèdic des del descobriment de la presència d'aquest en humans adults. Recentment, però, s'ha vist que les cèl·lules immunitàries del teixit adipós marró juguen un paper important en la regulació de la termogènesi.

Hi ha diversos tipus cel·lulars del sistema immunitari infiltrats en el teixit adipós. Tot i això, el tipus majoritari, i en el que ens hem centrat en la tesi present, són els macròfags.

Els macròfags són cèl·lules del sistema immunitari que s'originen de la diferenciació d'un altre tipus cel·lular, els monòcits. Podem trobar macròfags pràcticament en tot els teixits de l'organisme com a cèl·lules residents, atents a l'entrada de qualsevol senyal aliè. En funció d'aquests senyals, els macròfags es poden activar cap a diferents fenotips, principalment el fenotip clàssic i el fenotip alternatiu (Figura 11).

L'activació dels macròfags al fenotip clàssic o M1 es dona en resposta a senyals normalment relacionades amb infeccions bacterianes, com ara en resposta al lipopolisacàrid (LPS) (component de la paret bacteriana dels gramnegatius). El fenotip M1 és un fenotip totalment inflamatori, mostra un elevat potencial bactericida i col·labora amb neutròfils i cèl·lules NK (*natural killers*) per a eliminar la infecció.

Per altra banda, en resposta a les interleucines IL4 i IL13, produïdes pels eosinòfils, els macròfags s'activen al fenotip alternatiu o M2. Aquest fenotip no és gaire inflamatori, sinó que esta més relacionat amb remodelació tissular i altres funcions a nivell homeostàtic (Chawla et al., 2011).

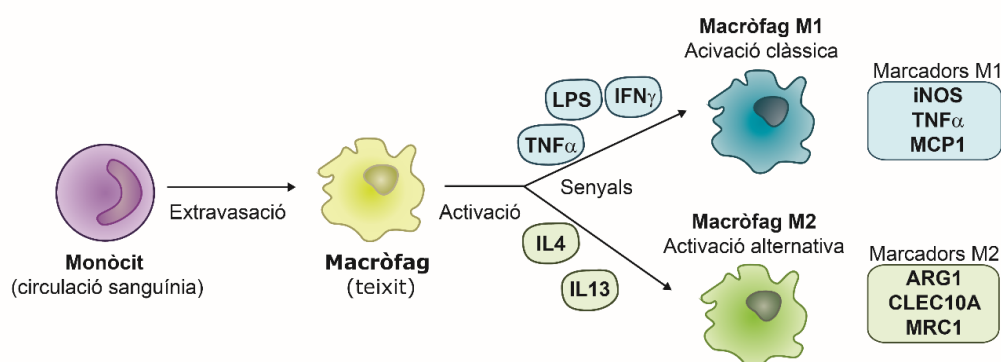


Figura 11. Esquema dels principals fenotips que poden adquirir els macròfags. Els monòcits presents en la circulació entren al teixit i donen lloc als macròfags, els quals s'activen a un fenotip o un altre en funció de les senyals que reben del seu entorn.

Els macròfags M1 en el teixit adipós marró

De la mateixa manera que en condicions d'obesitat augmenta la infiltració de macròfags en el teixit adipós blanc i aquests preferentment s'activen a M1 causant la inflamació del teixit, també s'ha descrit aquest augment en la infiltració i en el número de citocines inflammatòries (alliberades pels macròfags M1) en el teixit adipós marró. En aquest últim teixit, però, això ocorre en molta menor mesura.

L'increment en el nombre de citocines inflammatòries alliberades pels macròfags en condicions d'obesitat sembla reprimir el fenotip termogènic dels adipòcits marrons, així com dels adipòcits beix (Chung et al., 2017b). Una de les vies per les quals reprimeixen el fenotip termogènic és a través de la citocina TNF α (factor tumoral de necrosi α). TNF α s'ha vist que inhibeix l'expressió del gen *UCP1* en adipòcits marrons i beix (Sakamoto et al., 2016).

Els macròfags M2 en el teixit adipós marró

L'any 2011 es va publicar un estudi descrivint per primera vegada un paper important dels macròfags M2 en la regulació de la termogènesi. Es va veure com l'activació del TAM en resposta a l'estímul de fred comportava un augment dels marcadors M2 i una disminució dels marcadors M1 dins d'aquest teixit (Nguyen et al., 2011).

En aquest mateix estudi es proposa la secreció directa de noradrenalina per part d'aquests macròfags M2 com a via d'activació del TAM per part dels macròfags. Aquest fet, però, és encara controvertit; han aparegut estudis on demostren que els macròfags no presenten la capacitat de secretar directament noradrenalina (Fischer et al., 2017). No sembla ser, doncs, que l'activació del fenotip termogènic per part dels macròfags M2 sigui mitjançant l'alliberació directa de noradrenalina. Tot i això, els macròfags no serien el primer tipus cel·lular capaç d'activar el fenotip termogènic a través de factors independents de noradrenalina, com ja hem vist anteriorment en aquesta introducció.

A més a més, la comunicació entre el TAM i els macròfags no és unidireccional, s'ha descrit com els adipòcits marrons sota estímul adrenèrgic poden reclutar i activar macròfags M2, que a la vegada ajuden a l'activació de la termogènesi. Aquest any passat, en el laboratori, es va descriure la citocina CXCL14 (Lligand de tipus quimiocina amb motiu CXC 14) com una adipoquina marró (o batoquina) alliberada pels adipòcits marrons sota estímul adrenèrgic capaç de reclutar i promoure l'activació de macròfags M2, tant en el TAM com en el TAB promovent el *browning* (Figura 30) (Cereijo et al., 2018).

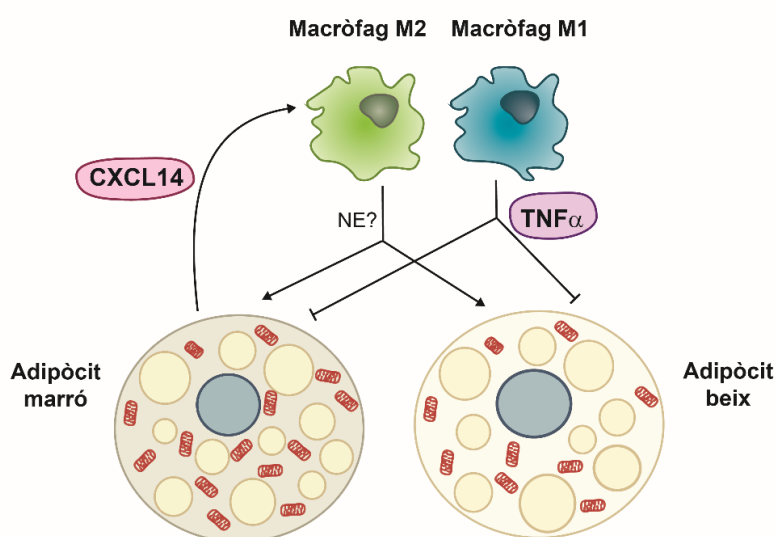


Figura 12. Resum de la comunicació entre el TAM i els macròfags. Mentre que els macròfags M1 reprimeixen el fenotip termogènic dels adipòcits marrons i beix, els macròfags M2 en són activadors. A més a més, els adipòcits termogènicament actius promouen la formació de macròfags M2 en detriment de macròfags M1.

2. EL FACTOR GDF15

2.1. La família TGFβ

Els membres de la família TGFβ són citocines secretables, amb funció i estructura similar, responsables de la regulació de processos cel·lulars molt diversos, com la proliferació, la migració o la diferenciació cel·lular.

En els mamífers, dins d'aquesta família hi trobem més de 33 citocines diferents que podem classificar en 4 subfamílies, segons la semblança en les seqüències i/o segons la funció (Figura 13). Així, trobem la subfamília Activina/Inhibina, la subfamília dels factors TGFβ, la subfamília dels BMPs i dels GDFs (*Growth differentiation factors*) i, per últim, la subfamília dels membres més distants (Mueller and Nickel, 2012). Aquesta classificació, però, no està del tot consensuada i trobem variacions en la literatura.

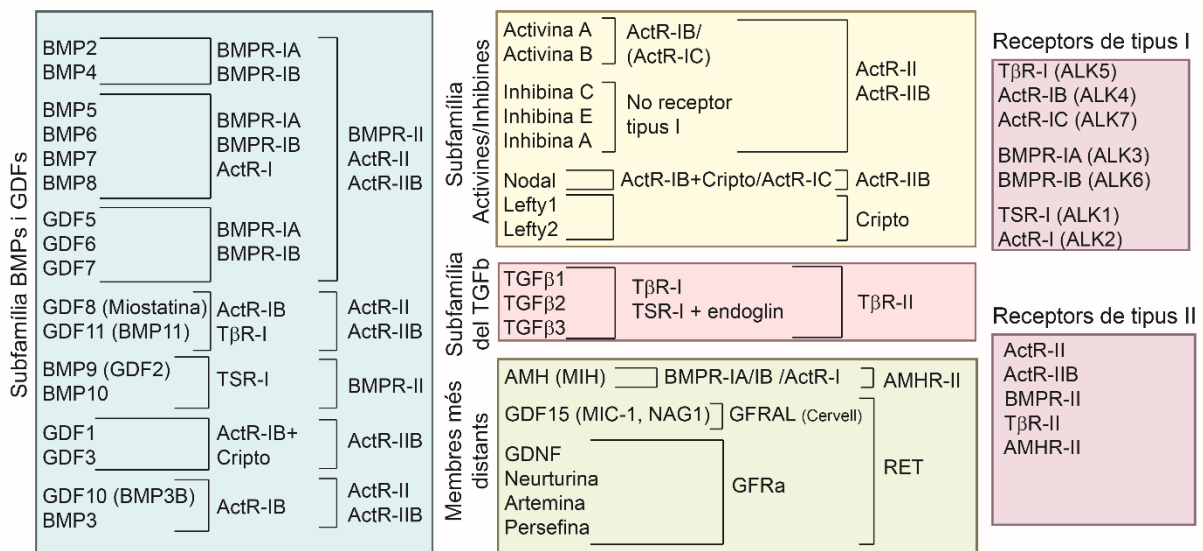


Figura 13 La família TGFβ. Els diferents membres de la família TGFβ classificats en 4 subfamílies i els receptors amb els que interaccionen. Adaptada de Mueller and Nickel, 2012.

- **Subfamília Activina/Inhibina:** Les activines i les inhibines van ser inicialment descrites com a citocines reguladores de la hormona FSH (hormona estimuladora del fol·licle) en les gònades; les inhibines, inhibint la secreció de la FSH i les activines, estimulant-ne la secreció (Ling et al., 1986). Posteriorment, es van descriure altres funcions molt diverses per aquestes citocines i en altres teixits, per exemple funcions en l'organogènesi o la inflamació (Hedger et al., 2011). En aquesta subfamília també hi trobem les citocines Nodal, Lefty1 i Lefty2; necessàries per l'establiment de la simetria esquerra-dreta durant el desenvolupament embrionari (Brennan et al., 2002).

- **Subfamília TGF β :** Està formada únicament per tres membres: el TGF β 1, el TGF β 2 i el TGF β 3. Aquests, com la majoria dels membres de la família TGF β , són factors pleiotròpics que controlen la proliferació i la diferenciació de tipus cel·lulars molt diversos. Estan involucrats en funcions molt diverses com el control de la immunitat, la cicatrització (promovent la fibrosi) o el desenvolupament embrionari i, en funció del context, poden dur a terme funcions oposades. Els TGF β s han estat àmpliament estudiats en l'àmbit del càncer, on juguen un paper dual. Per una banda, actuen a temps inicials del càncer com a supressors de tumors inhibint el creixement cel·lular; bloquegen el cicle cel·lular a la fase G1. Per altra banda, en estadis avançats del càncer, promouen la metastasi actuant com a inductors de la transició cel·lular epitel·li-mesènquima (Zhang et al., 2014).
- **Subfamília BMPs i GDFs:** Es tracta de la subfamília més gran, formada per més de 15 membres en els humans. De la mateixa manera que la majoria dels membres de la família TGF β , els BMPs i els GDFs presenten funcions molt diverses en funció de l'estat de la cèl·lula i del tipus cel·lular. D'aquesta manera, el membre BMP2 està també involucrat en el desenvolupament del cor, BMP7 és crític pel desenvolupament dels ronyons, i participa en el desenvolupament del cor i dels ulls, i GDF8 és un regulador negatiu del creixement muscular.
- **Subfamília dels membres més distants:** Finalment, trobem els membres més distants que per similitud de seqüència i funció no es poden classificar en cap de les subfamílies anteriors. Dins d'aquesta subfamília trobem GDF15, AMH (*Anti-Müllerian hormone*) i els membres de la família GDNF (*Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor*) (GDNF, artemina, persefina i neurturina). GDF15 s'ha vist augmentat en multitud de malalties i sembla tenir un paper en inflamació. Els membres de la subfamília GDNF són factors neurotròfics que regulen el creixement de les neurites (dendrites i axons) de les neurones, així com de la captació de dopamina per part de les neurones dopaminèrgiques. A més a més, els membres de la subfamília GDNF, a diferència dels altres membres de la família del TGF β , no senyalitzen a través dels receptors d'aquesta família sinó que ho fan a través d'uns receptors amb activitat tirosina cinasa que descriurem més endavant (Mueller and Nickel, 2012). Tot i això, la subfamília GDNF no sempre la trobem classificada dins la família TGF β (Saarma, 2000).

2.1.1. Estructura dels membres de la família TGF β

Els membres d'aquesta família són polipèptids llargs, formats per 3 segments diferenciats i, que dimeritzen formant homodímers (o heterodímers en el cas de les inhibines). Així, cada polipèptid esta format pels següents segments:

- **Pèptid senyal amino-terminal:** Aquest segment és descartat durant la translocació del polipèptid al lumen del reticle endoplasmàtic (RE) rugós.
- **Pèptid precursor:** En funció del membre de la família tindrà una llargada compresa entre els 150 i els 450 residus. És el segment amb la seqüència menys conservada dins dels diferents membres de la família i ajuda en el plegament i secreció de la proteïna.
- **Pèptid madur:** Segment carboxi-terminal. Segment que, una vegada alliberat, donarà lloc a la proteïna activa.

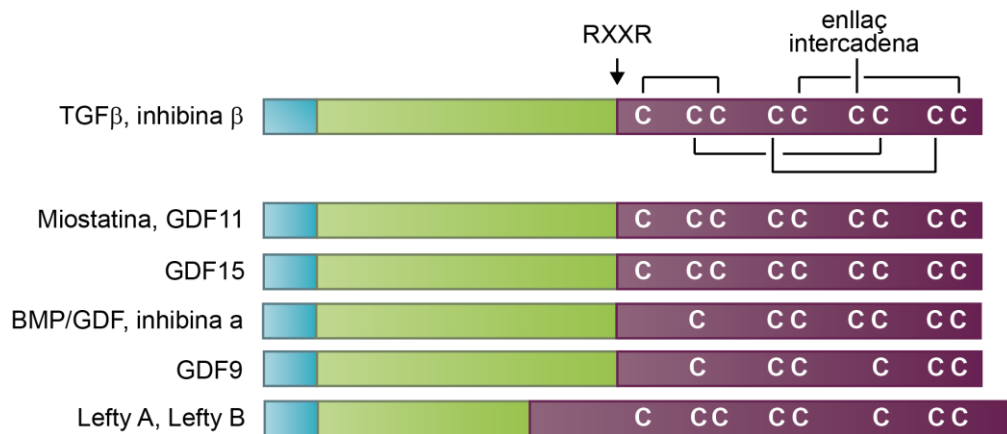


Figura 14. Representació esquemàtica dels residus cisteïna d'alguns dels membres de la família TGF β . En la figura podem veure representats els 3 segments: pèptid senyal (blau), pèptid precursor (verd) i pèptid madur (lila), així com el número de residus de cisteïna en el pèptid madur que formen enllaços disulfur intracadena i intercadena. RXXR: lloc de tall de la convertasa. Adaptada de Morikawa et al., 2016.

Una de les principals característiques dels membres d'aquesta família és la presència d'un domini nus de cisteïnes en la seqüència del pèptid madur, que els hi confereix una estructura 3D específica. Aquest domini consta d'una sèrie de residus cisteïna (el número de les quals pot variar en funció de la citocina) que formen enllaços disulfur. Exceptuant un dels residus, que forma enllaç amb un residu de l'altre cadena per unir el dímer, la resta de residus cisteïna formen enllaços intracadena (Figura 14) (Morikawa et al., 2016).

Generalment, els membres de la família surten del RE en la seva forma precursora (pèptid precursor i pèptid madur units i dimeritzats) i una vegada al Golgi són tallats entre el pèptid precursor i el domini madur per proteïnes convertasa. Trobem set tipus diferents

d'aquestes proteïnes convertasa (PC1, PC2, furina, PC4, PC5, PACE4 i PC7) residint la majoria d'elles en el Golgi. Els membres Nodal i Miostatina en serien una excepció, ja que són tallats a la matriu extracel·lular per proteïnes convertasa secretables (Hinck et al., 2016).

2.1.2. Senyalització de les proteïnes de la família TGF β

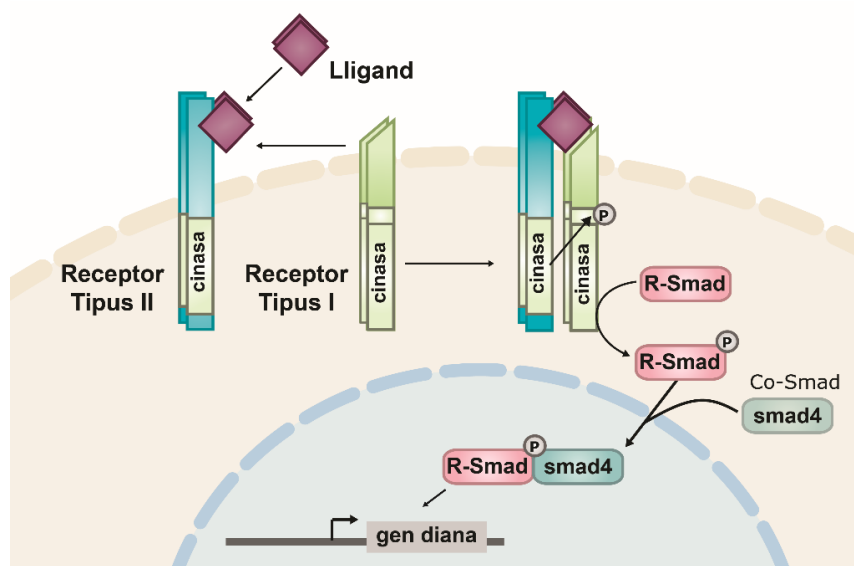


Figura 15. Via clàssica de senyalització dels lligands de la família TGF β . Els receptors de tipus II uneixen el lligand i recluten i fosforilen els receptors de tipus I. Aquests, activen les proteïnes R-smad, que juntament amb la proteïna smad4, activen la transcripció dels gens diana. Adaptada de Massagué et al, 1998.

Els principals membres de la família TGF β senyalitzen a través de les dues mateixes famílies de receptors conegudes com la família dels receptors tipus I i la família dels receptors tipus II. Tot i que hi ha un gran nombre de lligands de la família TGF β (ja hem esmentat que en són més de 30) només s'han descrit 7 receptors diferents de tipus I i 5 de tipus II. Els receptors de la família TGF β són receptors amb activitat serina/treonina cinasa. La presència del lligand dimèric propicia la formació del complex receptor heterotetramèric, format per dos receptors de tipus I i dos receptors de tipus II. La formació d'aquest complex comporta la fosforilació del receptor de tipus I per part del receptor de tipus II. El receptor de tipus I fosforilat fosforila unes proteïnes intracel·lulars efectores, anomenades R-Smad (Smads regulades per receptor). Hi ha més d'una R-smad diferent; els TGF β s i les inhibines activen les smad1 i smad3, els BMPs, per altra banda, activen les smad1, smad5 i smad8. Les R-smad activades formen un complex amb unes proteïnes anomenades co-Smad (Smad4 en els vertebrats) i, aquest complex és

transportat al nucli on regulen la transcripció dels gens diana (Massagué, 1998; Morikawa et al., 2016) (Figura 15).

2.1.3. Senyalització de la subfamília distant GDNF

Hi ha, però, alguns casos en els que membres més distants de la família TGF β no senyalitzen a través dels receptors de tipus I i de tipus II esmentats en l'apartat anterior. Aquest és el cas de la subfamília GDNF, composta pels membres GDNF, neurturina (NRTN), artemina (ARTN) i persefina (PSPN). Aquests factors senyalitzen a través de la família de receptors GFR α (*GDNF family receptors α*), formada per quatre membres (GFR α 1-GFR α 4) i a través del co-receptor RET (receptor tirosina cinasa).

Cada membre de la família GDNF té més afinitat per un dels receptors, així, trobem les combinacions GDNF-GFR α 1, NRTN-GFR α 2, ARTN-GFR α 3 i PSPN-GFR α 4. Per tal de transmetre el senyal, el lligand en forma d'homodímer s'uneix a dos receptors iguals GFR α formant un tetràmer. Aquesta estructura provoca la unió i dimerització de dos receptors RET, que desencadena l'activació dels seus dominis cinasa intracel·lulars i la seva auto-fosforilació per acabar donant lloc a una cascada de senyalització a l'interior de la cèl·lula (Figura 16) (Hätinen et al., 2007; Wang, 2013).

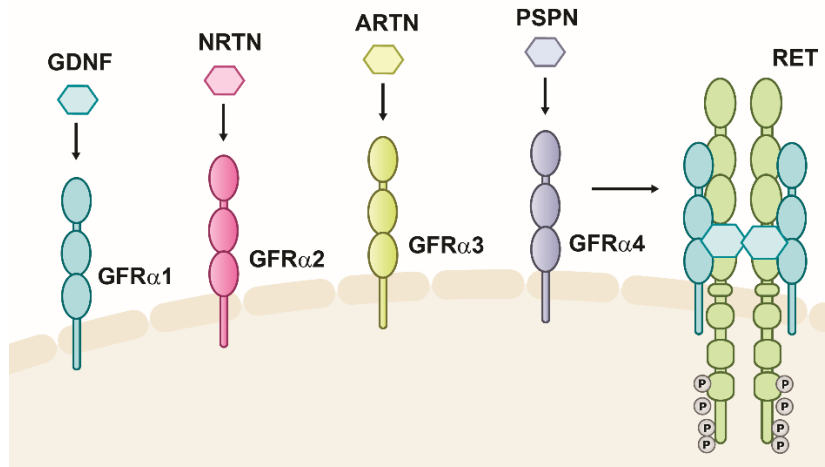


Figura 16. Representació esquemàtica de la senyalització dels membres de la subfamília del GDNF. Els lligands homodimèrics GDNF, NRTN, ARTN i PSPN s'uneixen als seus respectius receptors GFR α i promouen la unió i la dimerització del receptor RET, encarregat de transmetre el senyal. Adaptada de Airaksinen and Saarna, 2002.

2.2. GDF15, un membre divergent de la família TGF β

Ara fa aproximadament uns 20 anys sis laboratoris van publicar en poc temps la descripció d'un nou factor secretable de la família TGF β . Aquest factor va rebre diferents noms en funció del context en el que va ser descobert en cada laboratori. Aquests noms van ser: PLAB (*Placental BMP*) (Hromas et al., 1997), MIC-1 (*Macrophage inhibitory cytokine 1*) (Bootcov et al., 1997), PTGFB (*Placental transformin growth factor beta*) (Lawton et al., 1997), NAG-1 (*Nonsteroidal anti-inflammatory drug activated gene 1*) (Baek et al., 2001), PDF (*Prostate-derived factor*) (Paralkar et al., 1998) i GDF15 (*Growth differentiation factor 15*) (Böttner et al., 1999). Actualment, però, el nom més utilitzat és el de GDF15, i és aquest amb el que ens referirem a aquest factor en aquesta tesi.

La proteïna GDF15 és coneguda, principalment, com una citocina de resposta a estrès. La seva expressió augmenta en resposta a dany i inflamació en general, via els factors de transcripció p53 i EGR-1 (*early growth response protein 1*) (Lim et al., 2007; Osada et al., 2007; Tan et al., 2000). Els nivells circulants de GDF15 augmenten considerablement i en un termini curt de temps en diversitat de patologies com són diversos càncers, malalties cardiovasculars o malalties inflamatòries. També trobem un augment en els nivells circulants d'aquesta proteïna en situacions no patològiques com són la gestació, l'envelliment o l'exercici físic.

La proteïna GDF15 la trobem a la circulació en un rang de 200-1200 pg/mL en condicions normals, en el cas dels humans (Wiklund et al., 2010). El teixit que en produeix en més quantitat és la placenta (Hromas et al., 1997). En menor quantitat, també en són productors altres teixits com ara el fetge, el pàncrees, el múscul esquelètic, els ronyons, els macròfags o els teixits adiposos (Bootcov et al., 1997; Ding et al., 2009; Kalko et al., 2014; Koopmann et al., 2004; Li et al., 2018a).

2.2.1. Estructura de GDF15

El gen que codifica per la proteïna GDF15 el trobem localitzat en el cromosoma 19 en el cas dels humans i en el cromosoma 8 en el cas del ratolí. Els gens de les dues espècies comparteixen un 68,8 % de seqüència. La seqüència del gen de GDF15 consta aproximadament d'uns 3000 parells de bases i està formada per dos exons, separats per un intró. El monòmer resultant està format per 308 aminoàcids en els humans i per 303 aminoàcids en el cas del ratolí (Bootcov et al., 1997) (Figura 17a). GDF15, com a membre de la família TGF β , presenta l'estructura típica dels membres d'aquesta família. El polipèptid resultant de la traducció del gen *GDF15* consta de 3 segments diferenciats:

pèptid senyal a l'extrem amino-terminal, pèptid precursor (o domini propèptid) i pèptid o domini madur a l'extrem carboxi-terminal.

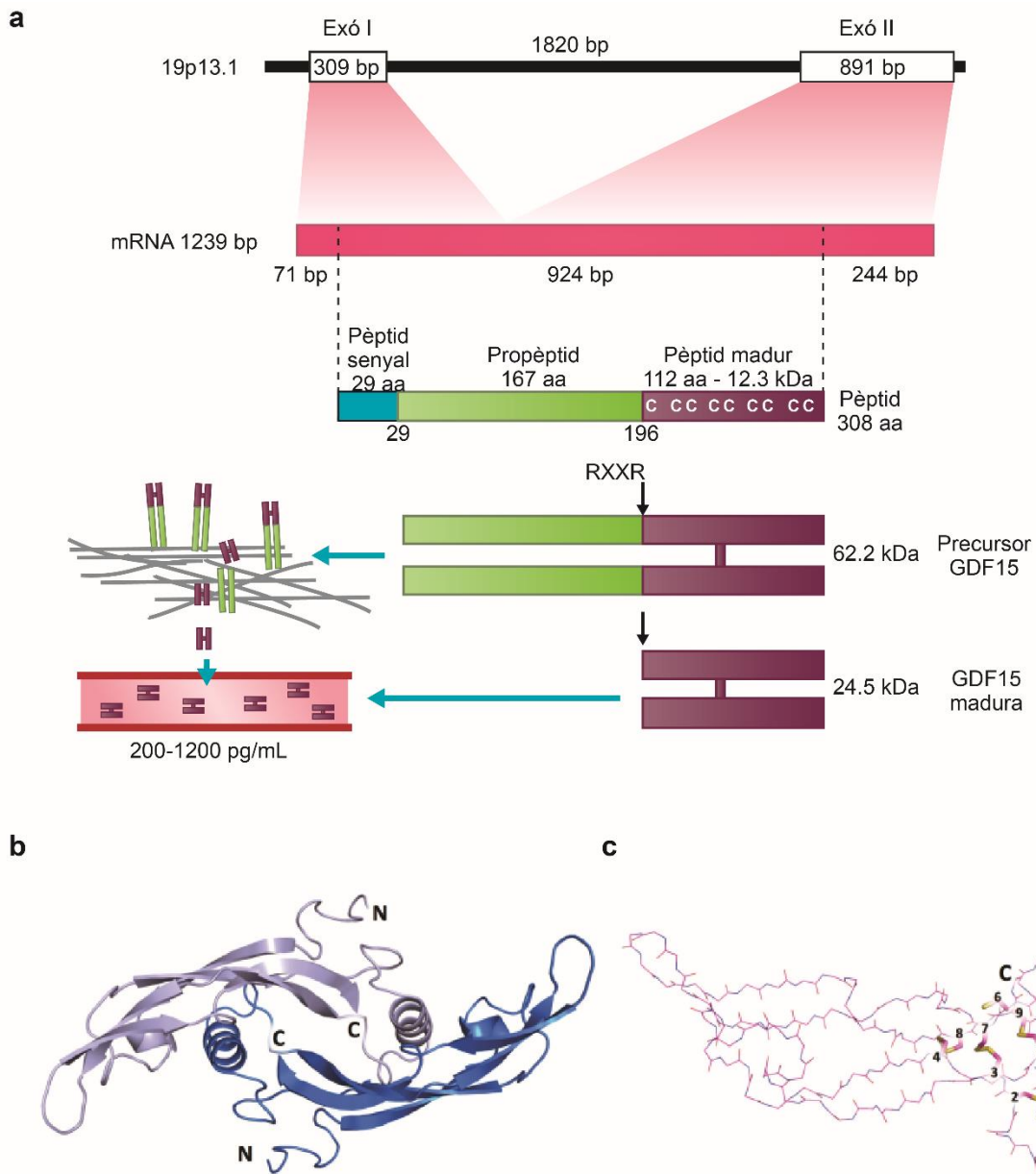


Figura 17. Estructura de GDF15. **a)** GDF15 és sintetitzada com una proteïna dimèrica de 62 kDa que és processada intracel·lularment per donar lloc a la proteïna dimèrica madura de 25 kDa. En certes circumstàncies, però, pot ser secretada com a forma precursora i ser processada a la matriu extracel·lular. **b)** estructura cristal·litzada del dímer de GDF15 a una resolució de 1.97 Å i **c)** estructura d'un monòmer de GDF15 on es veuen els enllaços disulfur intracadena. Adaptada de Tsai et al., 2018 i de Hsu et al., 2017.

Dins del domini madur trobem el clàssic nus de cisteïnes; en aquest cas format per 9 cisteïnes. Les 9 cisteïnes del domini madur formen quatre enllaços disulfur intracadena i un enllaç disulfur intercadena amb un residu de cisteïna d'un altre monòmer de GDF15,

per tal d'unir el dímer. Aquest domini de cisteïnes difereix dels de la resta de membres de la família en la seva configuració. GDF15 presenta enllaços disulfur entre les cisteïnes 1-2 i entre les cisteïnes 3-7, mentre que la resta de membres de la família amb nou cisteïnes presenten els enllaços 1-3 i 2-7 (Figura 17c i 18). La dimerització dels dos monòmers de GDF15 té lloc en el reticle endoplasmàtic.

El precursor de GDF15, en forma de dímer, passa del RE a l'aparell de Golgi on és processat per una proteasa que el talla per la seqüència RXXR, donant lloc a la forma madura de GDF15 de 25 kDa. Aquesta, presenta una estructura secundària formada per 6 làmines β i 1 hèlix α per monòmer (Figura 17b). Finalment, la forma madura de GDF15 és secretada de la cèl·lula a la circulació. A diferència dels altres membres de la família TGF β , el pèptid precursor de GDF15 no és necessari pel correcte plegament de la proteïna ni per la correcta secreció del dímer madur (Bauskin et al., 2000).

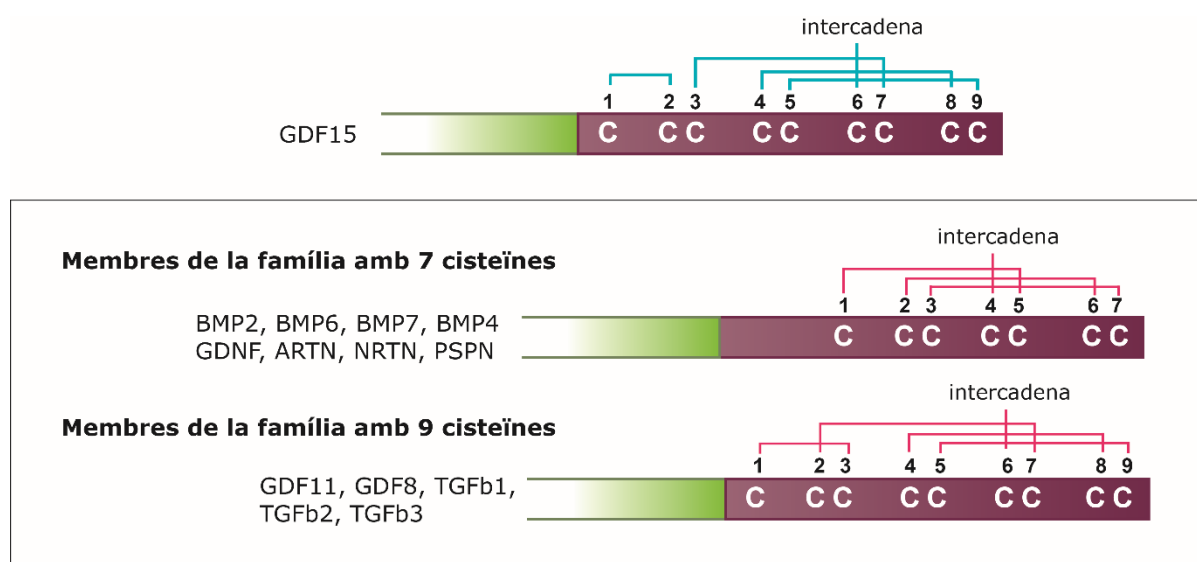


Figura 18. Enllaços disulfur de GDF15. Representació esquemàtica de la localització de les cisteïnes en el domini madur de GDF15 i localització dels enllaços disulfurs, en comparació amb altres membres de la família TGF β Hsu et al., 2017.

Existeix, però, una via alternativa en la que el precursor de GDF15, una vegada dimeritzat, surt de l'aparell de Golgi abans de ser processat i és secretat a la matriu extracel·lular en la seva forma precursora. Tot i que no es coneixen bé les vies de secreció, sí que es coneix que la via de secreció de la forma precursora és diferent de la de la forma madura, essent la primera més ràpida. Una vegada el precursor és secretat, aquest no surt a la circulació sinó que és retingut a la matriu extracel·lular, formant una reserva de GDF15 fora de la cèl·lula. Aquest fet li permet a la cèl·lula reaccionar de manera més ràpida a les diferents necessitats de GDF15 circulant. D'una banda, pot disminuir la quantitat de GDF15 madura secretada augmentant la secreció del precursor front la secreció de la forma madura i

reservant aquest precursor a la matriu extracel·lular. Per altra banda, pot processar el precursor de GDF15 de les reserves de la matriu extracel·lular i alliberar-la ràpidament a la circulació en la seva forma madura, front a una necessitat immediata de GDF15 circulant (Figura 17a) (Bauskin et al., 2010).

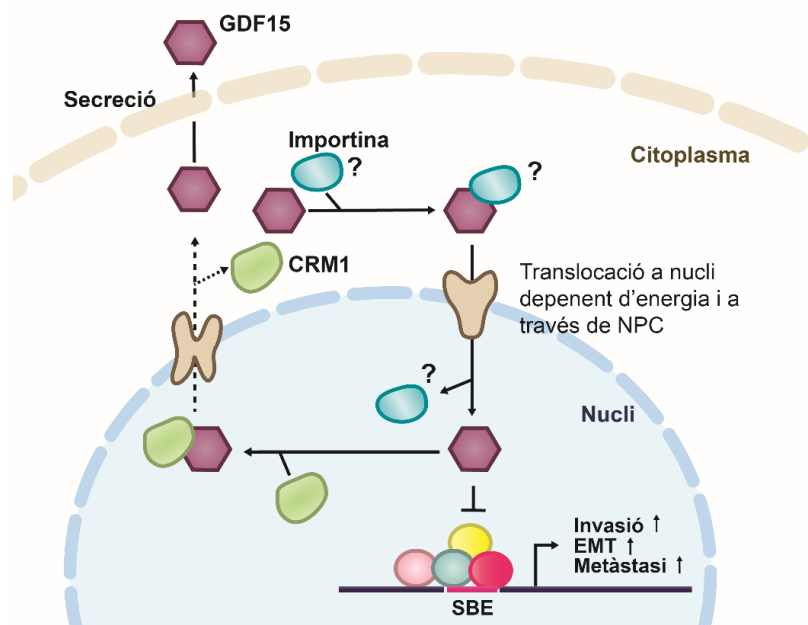


Figura 19. Model proposat per la entrada i sortida de GDF15 al nucli. GDF15 entra al nucli mitjançant un transport actiu, dependent d'energia, un cop dins regula la transcripció de gens diana i surt fora del nucli ajudat per CRM1 per acabar sent alliberat al medi extracel·lular. Adaptada de la referència Min et al., 2015.

La forma precursora, a més a més, sembla tenir també activitat biològica intracel·lular. Aquesta forma precursora entra al nucli cel·lular mitjançant un transport actiu i a través dels complexos de porus nuclears (NPC) (Figura 19). GDF15 no presenta cap senyal clàssica d'entrada a nucli, tot i això conté dues regions que semblen ser d'importància en aquest procés. Aquestes regions són la regió compresa entre els aminoàcids 190-197 i la regió compresa entre els aminoàcids 211-218. No es coneix si GDF15 requereix de la unió amb una altra proteïna que sí que presenti aquesta senyal d'entrada o ho fa per un altre mecanisme.

Un cop dins del nucli, GDF15 és capaç de modificar la transcripció. En el context del càncer, el precursor de GDF15 actuaria bloquejant la unió de les proteïnes SMADs al DNA (àcid desoxiribonucleic) i reprimint l'acció protumorigènica del factor TGFβ.

Finalment, el precursor de GDF15 surt del nucli ajudat per CRM1 (*chromosome region maintenance 1*), un factor clau per l'exportació de proteïnes del nucli al citoplasma. El precursor de GDF15 presenta una seqüència canònica de sortida de nucli, NES, a la regió

N-terminal, en concret entre els aminoàcids 14 i 29. Aquesta seqüència és reconeguda pel factor CRM1. Al mutar la seqüència NES, GDF15 no només queda retinguda al nucli, sinó que també en queda bloquejada la secreció al medi extracel·lular (Min et al., 2015).

2.2.2. GFRAL: El receptor de GDF15

Recentment, quatre laboratoris farmacèutics van publicar simultàniament la descripció del receptor de GDF15. En aquests articles demostren com GDF15, a cervell, senyalitza a través d'un receptor, fins aleshores orfe, anomenat GFRAL (GDNF family receptor α -like) (Emmerson et al., 2017; Hsu et al., 2017; Mullican et al., 2017; Yang et al., 2017).

El receptor GFRAL va ser descrit l'any 2005 com un homòleg distant de la família dels receptors de GDNF, GFR α (Li et al., 2005), família descrita anteriorment en l'apartat 2.1.3. La seqüència del receptor GFRAL consta únicament de 23 aminoàcids i no presenta domini intracel·lular amb activitat cinasa. Per tal de transmetre el senyal, GFRAL requereix del co-receptor RET. RET també s'ha descrit anteriorment com el co-receptor amb activitat tirosina cinasa dels receptors GFR α .

D'aquesta manera, i tal i com es mostra a la figura 20, l'homodímer de GDF15 madur interacciona amb dos receptors GFRAL. Aquesta interacció permet la unió de dos co-receptors RET, que són els encarregats de senyalitzar a través del seus dominis tirosina cinasa.

Tot i que el coreceptor RET s'expressa en varis teixits, l'expressió del receptor GFRAL és exclusiva de l'àrea postrema (AP) i del nucli del tracte solitari (NTS) del cervell, dos àrees implicades en la regulació de la ingesta (Mullican and Rangwala, 2018).

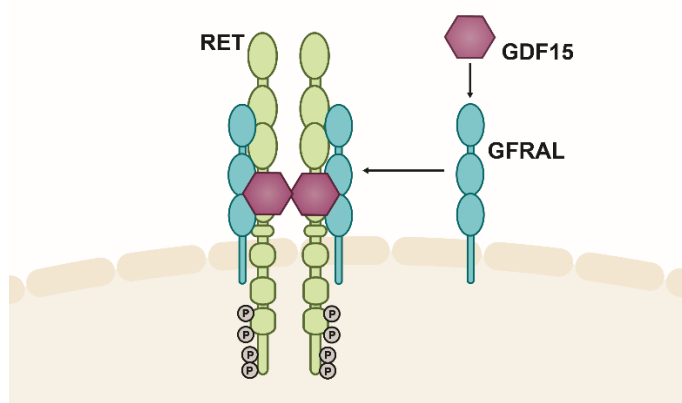


Figura 20. Interacció de GDF15 amb el seu receptor GFRAL-RET. Dues molècules de GDF15 s'uneixen a dos receptors GFRAL, que recluten dos co-receptors RET amb activitat tirosina cinasa. Adaptada de Airaksinen and Saarma, 2002.

2.2.3. GDF15 com a biomarcador de patologia

Els nivells circulants de GDF15 correlacionen positivament amb l'edat i augmenten considerablement en gran varietat de patologies, tals com determinats càncers, malalties inflamatòries, problemes d'homeòstasi energètica, patologia cardíaca, malalties mitocondrials o diabetis. De fet, s'ha descrit el factor GDF15 com a marcador general de malaltia i mortalitat (Wiklund et al., 2010) i s'està estudiant en molts àmbits diferents per poder utilitzar aquest factor com a biomarcador per a la detecció i el seguiment de múltiples patologies (Corre et al., 2013).

Càncer

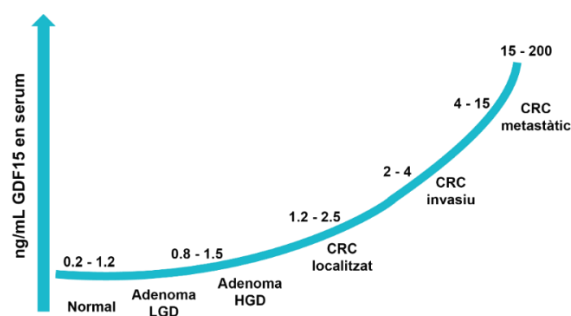


Figura 211 . Canvis en els nivells circulants de GDF15 en càncer. Diagrama de canvis representatius de GDF15 en serum en individus sans i en pacients en diferents estadis de càncer colorrectal. Adaptada de la referència Tsai et al., 2018.

El factor GDF15 es troba augmentat en sang en múltiples càncers; en el càncer de colon, de pròstata, de pàncrees, de mama, d'ovaris, de tiroides o de pell, entre d'altres. La funció de GDF15 en aquests càncers és controvertida i pot semblar contradictòria. Per una banda, GDF15 sembla tenir efectes protectors front el desenvolupament del tumor en estadis primerencs i en general front al desenvolupament del càncer. Aquestes observacions provenen d'estudis realitzats amb models de ratolí que desenvolupen el tumor des d'un inici. En un d'aquests estudis van creuar ratolins mutants pel gen APC (*Adenomatous polyposis coli*), que desenvolupen neoplàsia al tracte intestinal, amb ratolins transgènics per GDF15. Els ratolins resultants estaven protegits de la formació dels tumors. En canvi, quan creuaven ratolins deficientes per GDF15 i mutants pel gen APC els ratolins resultants perdien la protecció front la formació dels tumors (Wang et al., 2011).

Per altra banda, estudis realitzats amb ratolins inoculats amb tumors humans mostren tots ells un efecte oposat de GDF15. En comptes de veure un efecte protector, veuen un efecte positiu de GDF15 en la progressió del tumor. En un d'aquests estudis, el tractament amb un anticòs contra GDF15 inhibia el creixement d'un tumor de càncer d'esòfag

inoculat en ratolins (Wang et al., 2014). S'ha de tenir en compte però, el fet que aquests ratolins estan immunodeprimits, amb una resposta immunitària reprimida, i a més a més aquest tumors inoculats mimetitzen tumors en estadis avançats.

Sembla ser, doncs, que el factor GDF15 actua en estadis primerencs de multitud de tumors prevenint-ne la seva aparició i en estadis més avançats promovent la mobilització de les cèl·lules tumorals i el desenvolupament del tumor.

En estudis realitzats amb mostres de pacients amb càncer, els nivells de GDF15 circulants es troben augmentats en estadis molt inicials dels tumors. A més a més, en la majoria dels casos, aquest augment és més pronunciat en els casos amb pitjor prognòs (Figura 21). Aquestes observacions li confereixen una potencial funció com a biomarcador, tant pel primer diagnòstic del càncer, com pel seguiment de l'evolució d'aquest; sempre però, en combinació amb altres mètodes de diagnòstic degut a la poca especificitat de teixit i de tipus de tumor que presenta aquest factor (Tsai et al., 2018).

Caquèxia

La caquèxia es una síndrome multifactorial definida per una contínua pèrdua de massa muscular, amb o sense pèrdua de greix, que no pot ser completament revertida per complements nutricionals convencionals i que porta a una discapacitat funcional. Pot progressar a través de tres estadis: precaquèxia, caquèxia i caquèxia refractària (Figura 22). La síndrome de la caquèxia és molt comuna en càncers avançats; acostuma a disminuir considerablement l'efecte dels tractaments anticancerígens, així com a comprometre la supervivència del pacient.

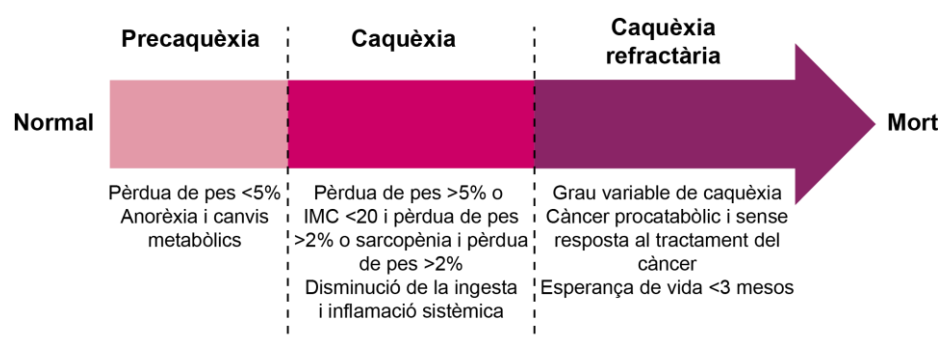


Figura 22. Estadis de la caquèxia en el càncer. Estadis pels quals pot avançar la síndrome de la caquèxia. No tots els pacients avançaran per tots els estadis. IMC: Índex de massa corporal. Adaptada de la referència Fearon et al., 2011.

Diversos estudis publicats mostren nivells circulants de GDF15 significativament més elevats en pacients amb important pèrdua de pes (amb caquèxia), dins de poblacions de pacients amb càncer. En aquests estudis, també es mostra una correlació positiva entre

els nivells de GDF15 i el grau de caquèxia. Tant l'augment de GDF15 com els nivells de caquèxia correlacionen positivament amb un pitjor pronòstic (Johnen et al., 2007; Lerner et al., 2016). Són necessaris, però, més estudis abans de poder utilitzar GDF15 com a biomarcador pel casos de caquèxia. Altrament, també s'esta estudiant la possibilitat d'utilitzar GDF15 com a teràpia per la caquèxia. Com veurem més endavant, la interacció GDF15-GFRAL promou una disminució en la ingesta i, per contra, el bloqueig d'aquesta interacció en provoca un augment i, per tant, un augment del pes corporal.

Malalties cardiovasculars

Les malalties cardiovasculars (CVD) són totes aquelles malalties relacionades amb el mal funcionament del cor i/o del sistema vascular (artèries i venes). Inclouen: l'aterosclerosi, la hipertensió, la hipertròfia cardíaca, la cardiopatia coronària o les malalties cerebrovasculars. Les malalties cardiovasculars són actualment una de les principals causes de mortalitat en tot el món, arribant a nivells d'epidèmia (Adela and Banerjee, 2015). El canvi en l'estil de vida, a una vida pràcticament sedentària i l'augment en el nombre d'individus que pateixen d'obesitat, entre altres factors, han augmentat la prevalència d'aquestes malalties.

Com en d'altres escenaris, GDF15 sembla tenir un paper dual en les CVD en funció del context i/o de l'estadi en el que es troba la malaltia. Sembla tenir un paper antihipertròfic, és a dir cardioprotector, quan actua activant la via de les Smad2/3, mentre que sembla tenir un paper prohipertròfic quan la via de la Smad1 està activa. GDF15 estimula el creixement i la secreció de col·lagen dels fibroblasts (promouent la fibrosi) (Xu et al., 2011).

El cor, tot i no ser un dels principals teixits productors de GDF15 en condicions basals, n'augmenta considerablement la seva producció en pacients que pateixen d'alguna d'aquestes malalties.

Després del primer estudi suggerint GDF15 com a biomarcador de risc cardiovascular (Brown et al., 2002), s'han publicat molts estudis sobre GDF15 en aquestes malalties. Alguns d'aquests es mostren en la següent taula:

Taula 1. GDF15 en les malalties cardiovasculars. Llistat d'estudis amb humans on s'han estudiat els nivells circulants de GDF15 en malalties cardiovasculars. Adaptada de la referència Adela and Banerjee, 2015.

Malaltia/població/ període de seguiment	Mida mostra	Principals descobriments	Referència
Infart agut de miocardi (AMI)	1142	GDF15 com a marcador de mort i de possible insuficiència cardíaca en pacients d'AMI.	(Khan et al., 2009)

Introducció

		Conjuntament amb el NT-pro-BNP s'aconsegueix una millor detecció dels pacients.	
Síndrome coronària aguda (ACS) (PROVE IT-TIMI 22)	3501	GDF15 es troba alterat en esdeveniments recurrents després de la ACS. GDF15 podria ser utilitzat com a marcador de pronòstic de la ACS.	(Bonaca et al., 2011)
Model humà de pèrdua de massa muscular després d'una cirurgia cardíaca.	42	GDF15 com a nou factor associat amb l'atròfia muscular. Potencial diana terapèutica en pacients de pèrdua de massa muscular aguda.	(Bloch et al., 2012)
ACS sense elevació del ST. Assaig (FRISC-II) (2 anys)	2079	GDF15 com a potencial eina per prendre decisions terapèutiques en pacients amb ACS sense elevació del ST.	(Wollert et al., 2007)
Població adulta general (Dallas Heart Study) (7.3 anys)	3219	GDF15 com a marcador de mortalitat i de aterosclerosi coronària.	(Rohatgi et al., 2012)
H-LVH, HCM	149	GDF15 pot ser un bon biomarcador per discriminar la cardiomiopatia hipertensiva (HCM) de la Hipertrofia hipertensiva del ventricle esquerre (H-LVH)	(Hanatani et al., 2014)
Pacients amb disfunció preclínica diastòlica o insuficiència cardíaca amb fracció d'ejecció normal (HFnEF)	119	GDF15 està augmentat en individus amb HFnEF i permet diferenciar una funció diastòlica normal d'una LVDD asimptomàtica	(Dinh et al., 2011)
Pacients amb malaltia isquèmica del cor estable (estudi Heart and Soul) (8.9 anys)	984	Observació de nivells més elevats de GDF15 en pacients amb malaltia isquèmica de cor estable amb més esdeveniments cardiovasculars	(Schopfer et al., 2014)
Pacients amb hipertensió sense tractar	299	Els nivells plasmàtics de GDF15 augmenten amb LVH en pacients hipertensos	(Xue et al., 2012)
Homes de 71 anys d'edat (estudi ULSAM)	940	En homes d'edat avançada, GDF15 millora la progressió tant cardiovascular, com la mortalitat per càncer, com la morbiditat, més enllà dels factors de risc establerts i els biomarcadors de disfunció cardíaca, renal i inflamació.	(Wallentin et al., 2013)
Insuficiència cardíaca (estudi Val-HeFT)	1734	GDF15 proporciona informació independent sobre el pronòstic en insuficiència cardíaca	(Anand et al., 2010)
Malaltia de les artèries coronàries (CAD)	553	Diferències significatives de GDF15, IMA i PAPP-A en pacients amb CAD. GDF15 podria estar associat amb la severitat de les CAD	(Fan et al., 2014)
Pacients amb hemodiàlisi	132	GDF15 com a nou marcador d'aterosclerosi, inflamació i malnutrició en pacients amb hemodiàlisi.	(Yilmaz et al., 2015)
Infart de miocardi amb elevació del segment ST (STEMI) (3 anys)	216	Nivells elevats de GDF15 prediuen mortalitat i insuficiència cardíaca en pacients amb STEMI	(Lin et al., 2014)
Dolor agut de pit (estudi APACE)	646	GDF15 és millor predictor de mortalitat que d'esdeveniments CV no fatals	(Mueller et al., 2004)

GDF15, doncs, sembla ser un biomarcador prometedor per a la detecció de malalties cardiovasculars, en combinació, però, amb altres biomarcadors.

Malalties mitocondrials

Podem definir les malalties mitocondrials com un grup heterogeni de malalties genètiques amb defectes en la cadena respiratòria mitocondrial. La cadena respiratòria mitocondrial, formada per cinc grans complexes, genera un gradient de protons a la zona entre membranes que és aprofitat pel complex V (ATP sintasa) per sintetitzar ATP. Les malalties mitocondrials involucren mutacions genètiques tant en el DNA mitocondrial com en el DNA nuclear. De fet, per un mitocondri sa són necessàries més de 1500 proteïnes, de les quals només 13 estan codificades en el DNA mitocondrial. D'aquestes, unes 100 proteïnes estan directament involucrades en la fosforilació oxidativa i en la producció d'ATP. En aquestes malalties trobem: mutacions en el DNA mitocondrial, mutacions en el DNA nuclear que afecten a gens directament relacionats amb el sistema OXPHOS, i mutacions en el DNA nuclear que afecten al manteniment del DNA mitocondrial.

Al afectar als mitocondris, orgànuls presents en tots els tipus cel·lulars, aquestes malalties no només afecten un teixit i òrgan sinó que en poden afectar varis, essent els teixits principalment afectats aquells teixits amb una major demanda i dependència d'ATP. Així, el múscul esquelètic, el sistema nerviós o el fetge són els principals òrgans afectats (Figura 23).

La prevalença aproximada d'aquestes malalties en la població és de 1 de cada 5000 persones i, al ser un grup de malalties molt heterogènies i que poden afectar a diversos teixits, el seu diagnòstic és complicat.

Actualment, entre els mètodes de diagnòstic utilitzats podem trobar l'anàlisi de fibres COX-negatives (deficients per la proteïna citocrom c oxidasa) per les que es requereix una considerable quantitat de biòpsia de múscul esquelètic, la mesura de l'activitat enzimàtica dels complexes de la cadena respiratòria (tècnica complicada i no sempre possible de realitzar), la seqüenciació del genoma sencer, o l'anàlisi de marcadors en sang (fins ara poc sensibles i poc específics), entre d'altres (Chinnery, 2015; Gorman et al., 2016).

Hi ha, per tant, la necessitat de trobar marcadors sensibles i específics per aconseguir que la detecció d'aquestes malalties sigui ràpida i fàcil.

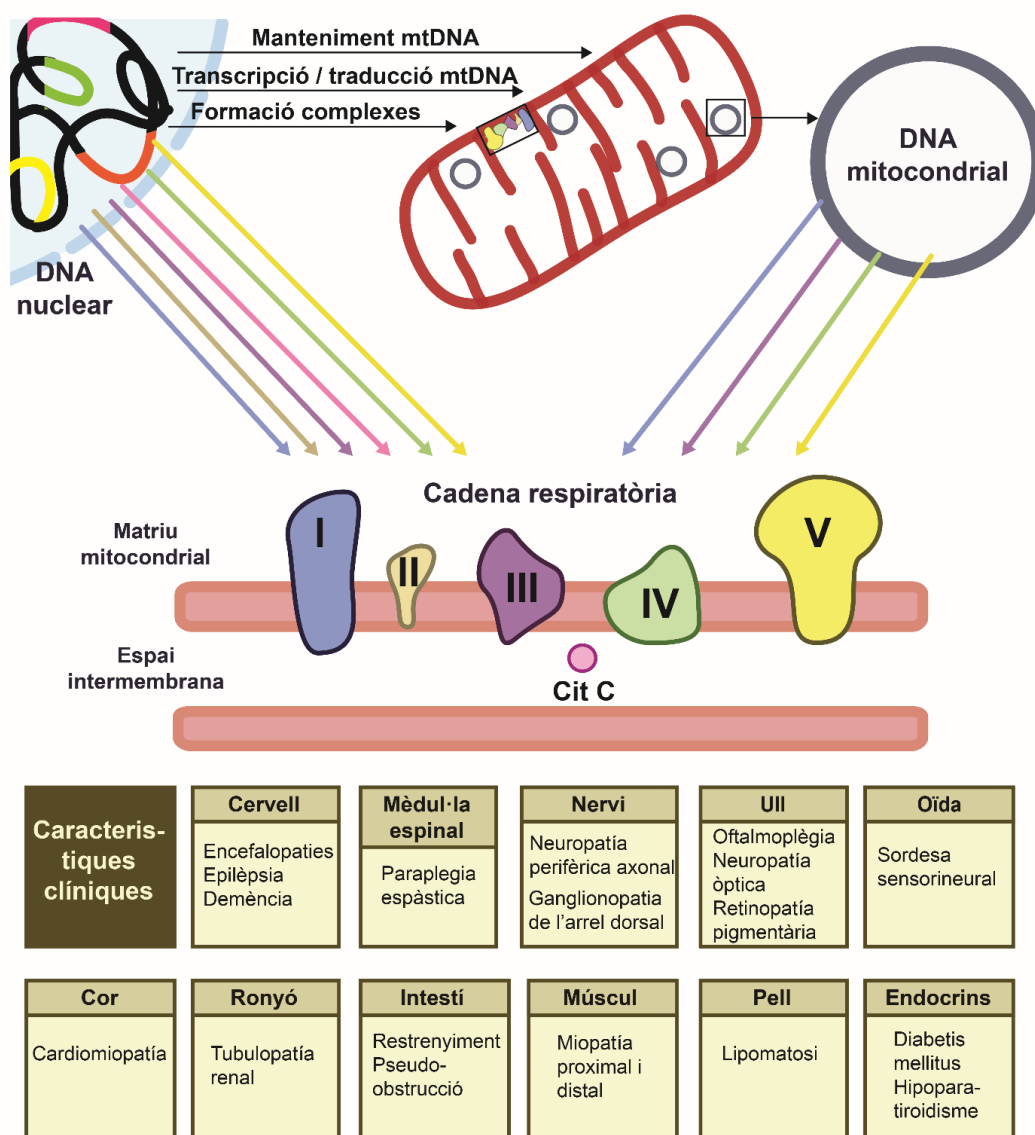


Figura 23. Biogènesi mitocondrial i característiques clíniques de les malalties mitocondrials. A la part central de la imatge hi trobem un esquema de la formació d'ATP pel procés de la fosforilació oxidativa, per la que són necessàries unes 90 proteïnes distribuïdes en 5 complexos a la membrana mitocondrial interna. 13 d'aquestes proteïnes estan codificades en el DNA mitocondrial i la resta ho estan en el DNA nuclear. Entre les proteïnes mitocondrials codificades en el DNA nuclear trobem proteïnes que formen part dels complexos, proteïnes que permeten la formació dels complexos o proteïnes encarregades del manteniment del DNA mitocondrial (mtDNA). Mutacions en aquests gens són els causants de les malalties mitocondrials. A la part inferior de la imatge veiem les característiques clíniques que poden presentar aquest grup tant heterogeni de malalties. Adaptada de Chinnery, 2015.

La síndrome de la depleció del DNA mitocondrial (MDS) és un subgrup de malalties mitocondrials, caracteritzades, com el seu nom indica, per la pèrdua de DNA mitocondrial. Aquestes, són causades per mutacions en gens nuclears que codifiquen per proteïnes involucrades en el manteniment del DNA mitocondrial. Un d'aquests gens nuclears és el

gen que codifica per la timidina cinasa 2 (TK2), involucrada en el manteniment dels nucleòtids en el mitocondri. Durant l'any 2014, es va publicar un estudi del grup de la Dra. Cecilia Jimenez-Mallebrera dut a terme amb biòpsies de múscul esquelètic de pacients amb mutacions en el gen TK2. Gràcies a un *microarray* d'expressió van trobar que els nivells de GDF15 es troben significativament més elevats en els casos dels pacients amb patologia mitocondrial en comparació amb biòpsies d'individus sans (Kalko et al., 2014).

Aquests resultats centren l'atenció en GDF15 com a possible nou biomarcador pel diagnòstic d'aquestes malalties.

Una part del projecte d'aquesta tesi, en col·laboració amb el laboratori de la Dra. Cecilia Jimenez-Mallebrera, s'ha centrat en l'estudi de GDF15 com a possible biomarcador pel diagnòstic de malalties mitocondrials en nens.

2.2.4. GDF15 en condicions no patològiques

Gestació

Diverses citocines de la família TGF β ; el TGF β 1, el TGF β 3, l'activina i la inhibina, han estat localitzades tant a la placenta com en el líquid amniòtic, regulant el creixement i la diferenciació de la placenta. Per altra banda, durant el part la concentració de citocines inflamatòries augmenta, i juntament amb una infecció uterina, pot portar a un avortament o a un part prematur. Tant TGF β 1 com la inhibina reprimeixen l'expressió de citocines pro-inflamatòries en els macròfags. Es creu que aquest efecte anti-inflamatori del TGF β 1 i de la inhibina, en el part, promou la supervivència del fetus (Moore et al., 2000).

Durant el primer trimestre de la gestació augmenten considerablement els nivells circulants de GDF15. Aquests segueixen augmentant a mesura que avança la gestació i fins al moment del part. No només augmenten els nivells circulants en la mare, sinó que el líquid amniòtic conté una gran quantitat de proteïna GDF15. Així doncs, el fetus està exposat a uns nivells molt elevats de GDF15 durant el seu desenvolupament. La font principal de tot aquest GDF15 que apareix durant la gestació és el trofoblast de la placenta. Al 2000, Moore et al van postular una possible funció de GDF15 durant l'embaràs inhibint la producció de citocines inflamatòries i, així, mantenint un correcte embaràs (Moore et al., 2000).

A principis del 2018, però, es va publicar un estudi genòmic de poblacions (*Genome wide association study*, GWAS) utilitzant com a participants dones embarassades clients de l'empresa *23andMe Inc*. En aquest estudi mostren una associació entre els nivells circulants de GDF15 i el fet de tenir nàusees i vòmits durant l'embaràs. També troben una

associació entre les nàusees i els vòmits i el receptor a cervell de GDF15, GFRAL (Fejzo et al., 2018).

Uns mesos després, va sortir publicat un estudi amb dades de GDF15 circulant de dones embarassades. En aquest estudi, es veu un increment en els nivells circulants de GDF15 en les dones que pateixen de vòmits durant el segon trimestre de l'embaràs i, aquest increment és encara més pronunciat en dones embarassades que han hagut de prendre antiemètics i que, per tant, presentaven episodis de vòmits més severes (Petry et al., 2018).

Aproximadament un 80% de les dones reporten haver patit de nàusees i vòmits durant l'embaràs. No se'n coneix del cert el motiu, tot i que hi ha una gran quantitat d'estudis associant l'aparició de nàusees i vòmits durant el primer trimestre de l'embaràs amb un millor resultat d'aquest, disminuint la probabilitat de que el fetus presenti defectes de naixement, de patir un part prematur o de patir un avortament involuntari, entre d'altres. Més enllà, s'ha postulat una hipòtesi on l'aparició d'aquestes nàusees i vòmits podria estar protegint tant la mare com el fetus front la ingesta de substàncies tòxiques (Patil et al., 2012).

Com descriurem més endavant en aquesta introducció, GDF15 actua a nivell central a través del receptor GFRAL promovent una disminució en la ingesta. Durant la gestació, doncs, GDF15 també podria tenir una funció a nivell central regulant la ingesta i, per tant, protegint front la ingesta de substàncies tòxiques tant pel fetus com per la mare (Petry et al., 2018).

GDF15 i el seu paper en l'exercici físic

L'*Homo sapiens* practica exercici des dels inicis de la seva existència com a espècie. Als inicis, l'exercici era necessari per la supervivència de l'individu, per exemple per l'obtenció d'aliments a través de la pràctica de la caça d'animals salvatges. Actualment, en l'època en que vivim, la pràctica de l'exercici no compromet de la mateixa manera la nostra supervivència. Tot i això, l'*Homo sapiens* no està preparat per dur una vida completament sedentària. Aquesta, ens augmenta considerablement el risc de patir diverses malalties, sent les més comunes les malalties cardiovasculars.

Però la pràctica de l'exercici físic pot no ser sempre beneficiosa. Com hem dit, el nostre cos necessita practicar activitat física però, fins a quin nivell podem forçar el nostre cos? Aquests últims anys s'ha estès la pràctica d'exercici físic de molta intensitat i durada. Entre aquestes activitats hi trobem curses com les maratons i les ultramaratons.

Les maratons són curses de llarga distància (42.2 km) en les quals es posa a prova la resposta del cos. Les ultramaratons són aquelles curses de llarga distància que superen

els 42.2 km de distància, normalment al voltant dels 100 km. S'ha d'anar en compte a l'hora de practicar aquests esports, ja que ja no formen part de l'exercici necessari i saludable pel cos humà, sinó que porten aquest fins a l'extrem i en comptes de prevenir malalties, poden augmentar el risc de patir-ne. Per aquesta raó, els atletes que practiquen aquestes activitats duen a terme una gran preparació física i passen gran quantitat de controls mèdics per minimitzar al màxim el risc al que estan exposats. És necessari, doncs, trobar biomarcadors per tal d'ajudar en el seguiment de l'estat metabòlic d'aquests atletes (Kratz et al., 2002; Ozemek et al., 2018). Com s'ha anat comentant al llarg d'aquesta introducció, GDF15 és una citocina de resposta a estrès també estudiada com a marcador de patologies cardiovasculars i per tant un possible biomarcador, també, en el context de l'exercici.

L'Espartatló és una ultramarató de Grècia de 246 km que es realitza en un màxim de 36h. En un estudi realitzat a Grècia amb 15 participants de l'edició del 2006 d'aquesta prova, es va observar un augment considerable en els nivells circulants de GDF15 en el moment de finalitzar la prova. GDF15 tendia a recuperar els nivells normals a les 48h d'haver acabat la prova (Tchou et al., 2009).

En un altre estudi on es van analitzar els nivells circulants de GDF15 dels membres de l'equip nacional d'Itàlia de rugbi després d'un entrenament intents durant 7 dies, es va poder relacionar un augment de GDF15 amb un augment del risc cardiovascular (Galliera et al., 2014).

Durant la realització de la tesi es publicà un altre estudi descrivint que l'exercici augmenta els nivells circulants de GDF15 en humans (Kleinert et al., 2018). En aquest estudi, 7 homes sans foren sotmesos a un exercici al 60% del seu VO_2 màxim durant 60 min. En aquest cas, es va controlar la dieta d'aquests individus des de 3 dies abans de la realització de la prova i s'agafaren mostres de sang a diferents temps. Els nivells circulants de GDF15 es van trobar elevats als 60 min de la prova, i encara seguien augmentant 2h després de la finalització. Els autors, conclouen que aquests nivells de GDF15 no provenen del múscul esquelètic després d'analitzar mostres de la vena i de l'artèria femoral.

En la present tesi s'ha volgut estudiar la resposta de GDF15 en una marató, cursa de gran intensitat i durada, però, on els corredors no estan obligats a passar controls mèdics i, actualment, pràctica molt comú d'una gran part de la població no atleta.

2.2.5. Acció central de GDF15 – Efectes anorexigènics de GDF15

Darrerament, amb el descobriment del seu receptor, els estudis d'aquesta proteïna s'han centrat en els seus efectes anorexigènics. Això, però, no és nou i ja des del 2007, 10 anys

abans de conèixer el receptor, trobem estudis postulant un efecte de GDF15 sobre la ingesta. El primer estudi que trobem en aquest aspecte relaciona GDF15 amb la pèrdua de pes associada a la caquèxia en pacients de càncer, i atribueix aquesta pèrdua de pes a una disminució en la ingesta causada pel factor GDF15 (Johnen et al., 2007). A partir d'aquest, trobem altres estudis també senyalant GDF15 com a una proteïna clau en la disminució de pes deguda a la ingesta.

Entre els diferents estudis que trobem, n'hi ha que van ser realitzats amb models de ratolí transgènics per sobreexpressió de GDF15. Aquests ratolins van resultar estar protegits front l'obesitat induïda per una dieta rica en greixos i, a la vegada, presentaven una ingesta disminuïda (Macia et al., 2012). Altres estudis es van realitzar amb el model de ratolí deficient per GDF15. En aquest cas, es posava de manifest una tendència d'aquests ratolins a patir obesitat i a presentar problemes metabòlics associats a aquesta obesitat, com ara una pitjor sensibilitat a la insulina, en comparació amb ratolins amb nivells normals de GDF15 (Tsai et al., 2013).

També abans del descobriment del seu receptor, al 2014, un estudi reconeix l'àrea postrema i el tracte del nucli solitari del cervell, dues àrees relacionades amb la regulació de la ingesta, com dues àrees necessàries pels efectes de GDF15 sobre la pèrdua de pes (Tsai et al., 2014).

Finalment, el descobriment de GFRAL com a receptor de GDF15 a l'any 2017, obre la possibilitat de treballar amb un model de ratolí deficient pel receptor de GDF15. Recordem que GFRAL només s'expressa en les àrees AP i NTS del cervell. Els primers estudis realitzats amb aquest nou model disponible els trobem en els mateixos articles en els que es descriu GFRAL com a receptor de GDF15 (Emmerson et al., 2017; Hsu et al., 2017; Mullican et al., 2017; Yang et al., 2017). En tots aquests estudis es corrobora l'efecte de GDF15 sobre la regulació de la ingesta i la pèrdua de pes.

Els efectes observats amb el tractament amb GDF15, com la pèrdua de pes i la millora del metabolisme de la glucosa, així com la disminució en la ingesta en els ratolins, es veuen abolits quan aquest tractament es dona a ratolins deficientes per GFRAL. GDF15, per tant, provoca una disminució en la ingesta dels animals portant a una pèrdua de pes i a una millora metabòlica de l'animal, i aquests efectes es donen a través del receptor GFRAL a les àrees AP i NTS del cervell.

Aquest factor, doncs, podria ser un bon candidat per al tractament de trastorns de la ingesta, com l'obesitat, però també per problemes antagònics a aquest com l'anorèxia nerviosa o la caquèxia associada a molts càncers, ja sigui administrant aquesta proteïna en els casos d'obesitat o bloquejant-ne el seu efecte en els casos d'anorèxia i caquèxia (Figura 24).

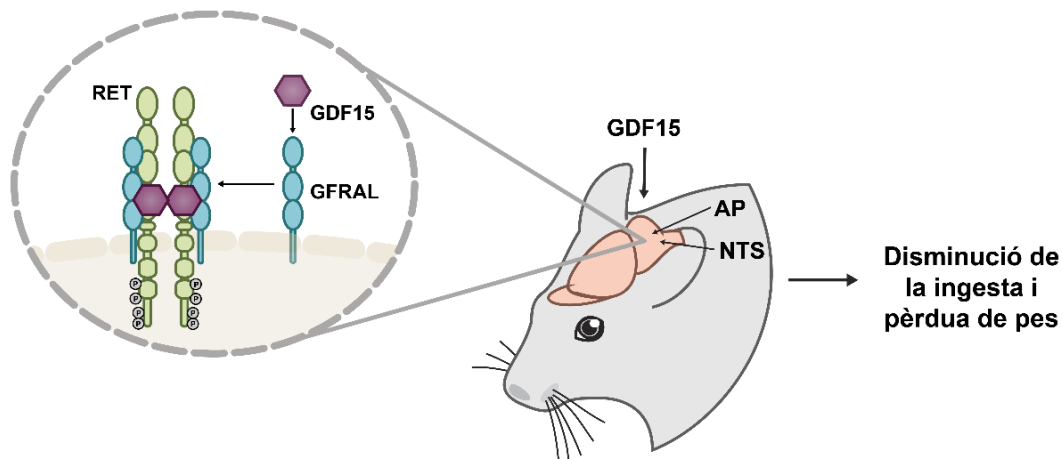


Figura 24. Efectes anorexigènics de GDF15. GDF15, a través del receptor GFRAL al cervell, promou una disminució en la ingesta i per tant desencadena la pèrdua de pes. Adaptada de Cimino et al., 2017.

2.2.6. Acció perifèrica de GDF15

Ja s'ha comentat com, el cervell, de moment, és l'únic òrgan on s'ha descrit la presència del recent descobert receptor de GDF15, GFRAL. Degut a aquest descobriment últimament la majoria d'estudis publicats es centren en la funció anorexigènica de GDF15 en el cervell, descrita a l'apartat anterior. Aquesta però, no és la única funció de GDF15. Ja des de que es va descriure aquesta proteïna l'any 1997 com a MIC-1 (macrophage inhibitory cytokine 1) trobem publicats efectes d'aquesta independents del cervell.

A l'any 1997 es mostra per primera vegada un efecte de GDF15 sobre els macròfags inhibint l'estat inflamatori. En aquest estudi van tractar macròfags amb GDF15 recombinant i els van activar a estat inflamatori amb LPS. En aquests macròfags activats, es va analitzar l'estimulació de l'alliberació de la citocina pro-inflamatòria $TNF\alpha$ en resposta al LPS. L'alliberació de $TNF\alpha$ va resultar bloquejada amb el tractament de GDF15 recombinant (Bootcov et al., 1997).

Si saltem a l'any 2017, el mateix any en que es publiquen els estudis on es descobreix GFRAL com el receptor de GDF15, es publica un estudi on es torna a parlar d'un efecte anti-inflamatori de GDF15 sobre els macròfags. En aquest cas, els autors es centren en els macròfags residents en el teixit adipós blanc. En condicions normals, els macròfags residents en el teixit adipós es troben principalment activats al seu fenotip M2, o anti-inflamatori. Per contra, en situació d'obesitat, els macròfags es troben preferentment activats al seu estat M1, o inflamatori, promovent una situació d'inflamació crònica, així com una resistència a la insulina en aquest teixit. La citocina interleucina 33 (IL-33), produïda pels adipòcits blancs, millora la sensibilitat a la insulina i protegeix del guany de

pes degut a una dieta rica en greixos. IL-33 promou l'activació de la secreció de GDF15 per part dels adipòcits i, GDF15, actua inhibint el fenotip inflamatori i promovent l'activació dels macròfags a M2, en detriment de M1 (Lee et al., 2017).

1 any més tard, el mateix grup d'investigació publica un altre estudi seguint la mateixa línia de recerca. En aquest cas, utilitzen un model deficient pel factor Crif1 (*CR6-interacting factor 1*), factor necessari per la formació de les subunitats OXPHOS i, per tant, un model que presenta la capacitat mitocondrial oxidativa alterada. Els macròfags amb funció oxidativa reduïda es troben predominantment activats a M1, provocant una inflamació del teixit adipós així com una resistència a la insulina. Aquests macròfags deficients de Crif1, a més a més, expressen menys GDF15. El tractament de ratolins obesos deficients per Crif1 amb GDF15 recombinant millora la funció oxidativa dels macròfags, promovent l'activació d'aquests al fenotip anti-inflamatori M2. Això, a la vegada, provoca una pèrdua de pes en comparació amb els mateixos ratolins sense tractar i una millora en la sensibilitat a la insulina i en general una millora metabòlica. Finalment, els autors descriuen que, en aquest cas, GDF15 esta senyalitzant a través dels receptors de tipus I i de tipus II de la família TGF β , ALK4,5 i 7 (Jung et al., 2018).

GDF15, doncs, pot actuar fora del cervell, i a través d'altres receptors, com a factor autocrí i paracrí dins del teixit adipós blanc ajudant a promoure la pèrdua de pes i a disminuir la inflamació que aquest teixit pateix en condicions d'obesitat.

Però l'efecte de GDF15 no es limita ni al cervell ni als macròfags. Altres estudis demostren una funció autocrina o paracrina de GDF15 en altres teixits. Un d'aquests estudis, publicat al 2005, prova un efecte antihipertròfic de GDF15 en cardiomiòcits. Cardiomiòcits tractats amb fenilefrina i angiotensina II, inductors d'hipertròfia cardíaca, i amb GDF15 mostren una menor hipertròfia en comparació amb cardiomiòcits induïts a hipertròfia però sense tractar amb GDF15 (Xu et al., 2006). D'altra banda, un altre estudi mostra que GDF15 té efectes inhibitoris en el reclutament de neutròfils en situació d'inflamació, inhibint les integrines responsables d'aquest procés a través dels receptors de tipus I (ALK5) i de tipus II (TGF β RII) (Artz et al., 2016).

2.2.7. GDF15 i el teixit adipós.

El teixit adipós blanc

GDF15 es descriu com a adipoquina l'any 2009, quan es troba present en els teixits adiposos blancs epididimal, perirenal i subcutani de ratolí i en els teixits adiposos blancs visceral i subcutani en humans.

Però el teixit adipós blanc no és un teixit compost exclusivament per un tipus cel·lular. Dins d'aquest teixit hi trobem adipòcits blancs, majoritàriament, però també precursors d'aquestes cèl·lules adipocitàries, cèl·lules del sistema immunitari i cèl·lules endotelials, entre d'altres. GDF15 està present tant en els adipòcits com en la fracció que inclou els altres tipus cel·lulars. De fet, GDF15 s'expressa tant en els preadipòcits, com en els macròfags, i en els adipòcits madurs.

Tant els preadipòcits com els adipòcits blancs madurs no només expressen la proteïna GDF15 intracel·lularment sinó que també la secreten al medi extracel·lular. Aquest fet li confereix la capacitat de tenir funcions paracrines/endocrines i, per tant, de ser una possible nova adipoquina (Ding et al., 2009).

El teixit adipós marró

La primera informació de GDF15 en el teixit adipós marró apareix l'any 2009, quan es troba expressió de GDF15 a nivell de mRNA en aquest teixit (Ding et al., 2009). No és, però, fins al mateix any de començar el projecte d'aquesta tesi, l'any 2014, que es publica un segon estudi on es relacionen els nivells de GDF15 amb la funció del teixit adipós marró. En aquest cas, ratolins amb sobreexpressió de GDF15 presenten nivells elevats d'expressió de gens relacionats amb la maquinària termogènica del teixit adipós marró (Chrysovergis et al., 2014). Per últim, durant el desenvolupament d'aquesta tesi, apareix un tercer estudi on es descriu un increment en l'expressió de GDF15 en resposta a l'activació termogènica per exposició al fred en el teixit adipós marró de ratolins (Verdeguer et al., 2015). No trobem, però, cap altre estudi centrat en el paper de GDF15 dins d'aquest teixit i, és per això, doncs, que aquesta tesi es va centrar en l'estudi del paper de GDF15 en el context del teixit adipós marró.

3. LA PROTEÏNA FGF21

3.1. La família dels FGF

Els membres de la família FGF (factors de creixement fibroblàstics) són una àmplia família de factors de creixement localitzats en un gran ventall d'organismes. Durant el desenvolupament embrionari, els FGF juguen un paper important en processos com la proliferació, la migració o la diferenciació cel·lular. En els adults, en canvi, presenten un paper homeostàtic, participant en la regulació tissular i en la resposta al dany cel·lular (Ornitz and Itoh, 2015).

En els vertebrats, s'han identificat 22 membres diferents que podem separar en 7 subfamílies, segons l'anàlisi filogenètic molecular, així com la conservació de la seqüència aminoacídica dels diferents factors entre ells (Figura 25).

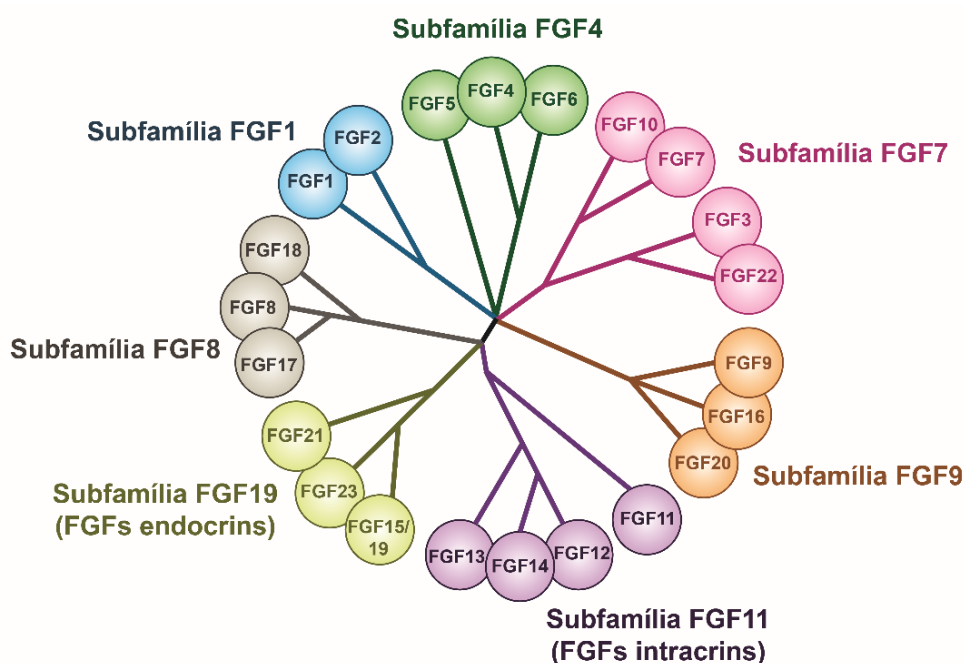


Figura 25. Subfamílies FGF. Relació filogenètica entre els membres de la família FGF en els mamífers. Adaptada de Maddaluno et al., 2017.

Els membres de la família FGF poden ser classificats en funció del mecanisme de senyalització utilitzat en factors intracrins, factors paracrins/autocrins i factors endocrins (Itoh and Ornitz, 2011):

- **Intracrins:** Aquests membres FGF no són secretats de la cèl·lula. El seu mecanisme d'acció, així com les seves dianes, és intracel·lular i, per tant, no requereixen de

receptor FGFR. Els membres FGF11, FGF12, FGF13 i FGF14 (subfamília FGF11) són factors intracrins.

- **Paracrins i autocrins:** Aquests membres posseeixen un pèptid senyal a la regió terminal que els permet ser secretats al medi extracel·lular i, que, a més, els permet la interacció amb els proteoglicans heparan sulfat. L'heparan sulfat actua mantenint aquests factors a la matriu extracel·lular, de manera que només poden actuar en la pròpia cèl·lula o en cèl·lules veïnes. En aquest cas si que requereixen de la presència dels receptors FGFR per poder actuar en les diferents cèl·lules. Els membres autocrins i paracrins són FGF1 i FGF2 (subfamília FGF1), FGF4, FGF5 i FGF6 (subfamília FGF4), FGF3, FGF7, FGF10 i FGF22 (subfamília FGF7), FGF8, FGF17, FGF18 (Subfamília FGF8) i FGF9, FGF16 i FGF20 (subfamília FGF9).
- **Endocrins:** Els factors FGF endocrins difereixen dels anteriors pel fet de tenir baixa afinitat per l'heparan sulfat, de manera que no queden retinguts dins el teixit de secreció i poden entrar a la circulació per actuar en teixits molt diversos. Aquests factors, per altra banda, per tal d'unir-se al receptor requereixen de la presència d'un co-receptor, una proteïna klotho. Els únics membres FGF endocrins són la subfamília FGF19; FGF21, FGF23 i FGF19/FGF15 (FGF19 en humans o FGF15 en ratolins).

Senyalització dels FGF

Excepte els factors intracrins, que actuen a nivell intracel·lular, la resta de membres FGF requereixen d'un receptor FGFR per tal d'actuar en una cèl·lula. Els receptors FGFR es caracteritzen per presentar tres dominis *immunoglobulin-like* extracel·lulars, dos d'ells d'unió al lligand (D2-D3), un domini d'unió a heparan sulfat, un domini transmembrana i un domini citoplasmàtic tirosina-cinasa. Entre els dominis D1 i D2 presenten la caixa àcida que, juntament amb el domini D1, té un paper d'autoinhibició (Figura 27a) (Goetz and Mohammadi, 2013; Wang et al., 1995).

Principalment, existeixen quatre receptors FGFR diferents; FGFR1, FGFR2, FGFR3 i FGFR4. Els diferents membres de la família FGF presenten diferent afinitat per cada un d'aquests receptors FGFR. S'ha descrit, però, un cinquè receptor, FGFR1, que no presenta domini cinasa intracel·lular i que semblaria tenir efectes inhibitoris (Silva et al., 2013).

Els FGF paracrins/autocrins necessiten els heparan sulfat com a cofactor per tal d'unir-se al receptor FGFR de la cèl·lula diana i promoure la formació del complex de transducció del senyal FGF-FGFR-HS, amb una relació 2:2:2 entre ells (Figura 26b). Els heparan sulfat són proteoglicans que es troben en grans quantitats a les superfícies cel·lulars i a la matriu

pericel·lular i extracel·lular. L'heparan sulfat, a la vegada que protegeix els FGF front la desnaturalització i la proteòlisi, evita la difusió d'aquests a l'espai intersticial (Goetz and Mohammadi, 2013; Itoh and Ornitz, 2011).

Els FGF endocrins, a diferència dels paracrins, presenten baixa afinitat per l'heparan sulfat. D'aquesta manera no són retinguts a la matriu extracel·lular i arriben a la circulació. Al no presentar una alta afinitat per l'heparan sulfat, necessiten una altra proteïna per tal de poder interaccionar amb el receptor FGFR de la cèl·lula diana, els co-receptors klotho (Kilkenny and Rocheleau, 2016). De proteïnes klotho n'existeixen 3 tipus diferents, α -klotho, β -klotho i γ -klotho. Aquestes proteïnes presenten dos dominis β -glucosilasa-like (excepte la proteïna γ -klotho, que només en presenta un), un domini transmembrana i una cua citoplasmàtica curta (Figura 26a i c). Mentre que α -klotho és específic per la senyalització d'FGF23, β -klotho és co-receptor per FGF21 i FGF19. γ -klotho, per altra banda, actua com a co-receptor addicional per FGF19. Les proteïnes klotho, juntament amb els receptors FGFR, donen l'especificitat de teixit als FGF endocrins, ja que la seva localització és exclusiva dels teixits diana dels seus FGFs (Fon Tacer et al., 2010).

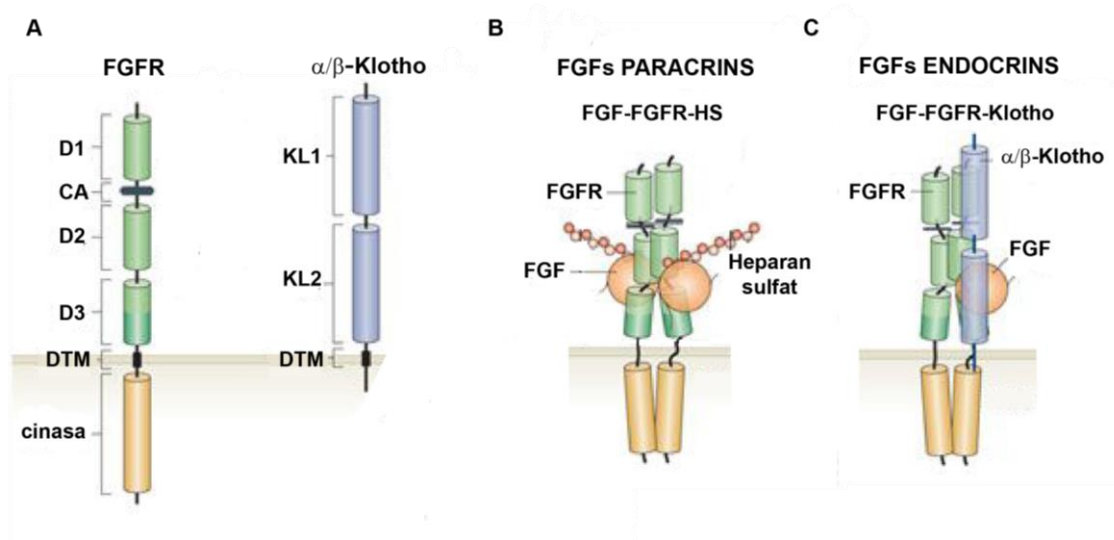


Figura 26. Senyalització de la família FGF. a) Estructura del receptor FGFR i del co-receptor klotho, b) senyalització dels membres paracrins de la família FGF i c) senyalització dels membres endocrins de la família FGF. Adaptada de Goetz and Mohammadi, 2013.

3.2. FGF21

La proteïna FGF21, descrita per primera vegada l'any 2000 (Nishimura et al., 2000), és un polipèptid de 209 i 210 aminoàcids en humans i ratolins respectivament. La proteïna FGF21 humana presenta una similitud de seqüència del 81% amb el seu ortòleg de ratolí i d'un 35% amb l'FGF19, l'FGF amb més similitud de seqüència amb FGF21. FGF21 és l'FGF endocrí més abundant, seguit d'FGF15/19 i d'FGF23. Aquest factor interacciona principalment amb el receptor FGFR1 i necessita del co-receptor β -klotho (KLB) per poder senyalitzar (Babaknejad et al., 2018).

En quant a la distribució i expressió (Figura 27), s'han descrit el fetge i el timus com els principals llocs de producció d'FGF21 (Nishimura et al., 2000), tot i això, també és expressat per altres teixits com és el pàncrees (Wente et al., 2006), el múscul esquelètic (Izumiya et al., 2008; Ribas et al., 2014) i el múscul cardíac (Planavila et al., 2013) o el teixit adipós blanc (Muisse et al., 2008) i el teixit adipós marró (Hondares et al., 2011). Cal destacar que FGF21 s'ha estudiat principalment en models de ratolí i en el cas dels humans només s'ha trobat expressió en el fetge i en el cervell (Staiger et al., 2017).

L'expressió d'FGF21 pot ser regulada per diferents mecanismes entre els quals trobem l'estat nutricional de l'organisme, l'activació dels receptors nuclears PPAR α /PPAR γ , l'exposició a baixes temperatures, situacions d'estrès oxidatiu i estrès de reticle o situacions de dany mitocondrial. Alguns d'aquests es resumeixen a continuació.

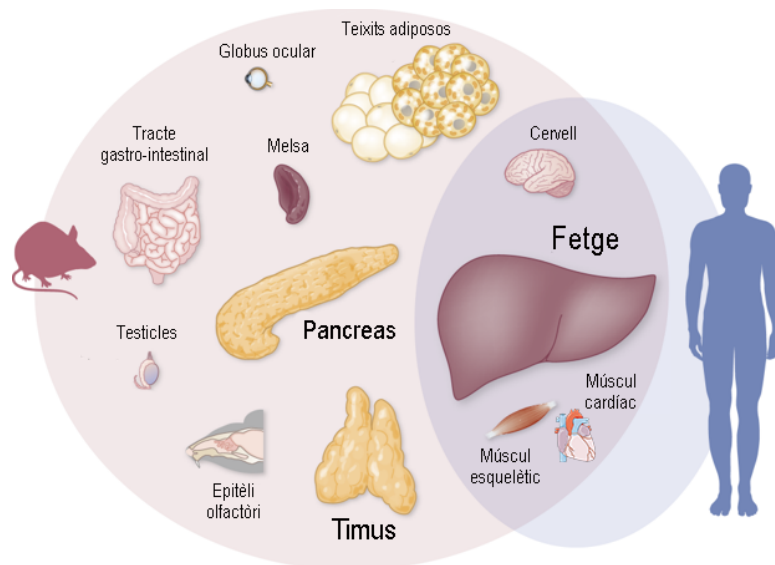


Figura 27. Expressió d'FGF21. Comparació dels principals llocs d'expressió d'FGF21 en ratolins i en humans. Adaptada de Staiger et al., 2017.

3.2.1. Regulació d'FGF21 durant el dejuni i l'alimentació

FGF21 en el fetge

És ben conegut que el fetge és un lloc clau de la regulació de la homeòstasi energètica. Front a la manca de nutrients (per exemple en un dejuni), el fetge activa la producció de glucosa i cossos cetònics que, després, allibera a la circulació. Simultàniament, el teixit adipós activa la lipòlisi i allibera a la circulació àcids grassos lliures i glicerol, que el fetge capta i utilitza per dur a terme aquestes funcions. Un regulador clau d'aquests processos en el fetge és el receptor nuclear PPAR α , que s'activa per àcids grassos i està involucrat en la regulació del metabolisme glucídic i lipídic en el fetge.

Està descrit que en resposta al dejuni augmenten els nivells circulants i hepàtics d'FGF21 així com que el promotor d'FGF21 conté un element de resposta a PPAR α . D'aquesta manera, front a un dejuni, trobem un augment dels àcids grassos circulants que són captats pel fetge on interaccionen amb el receptor nuclear PPAR α . La unió dels àcids grassos a PPAR α promou la translocació d'aquests al nucli on, a través de la formació del complex PPAR α -Àcid gras-RXR, activen la transcripció del gen d'FGF21. El fetge no només augmenta la concentració intracel·lular d'FGF21, sinó que n'augmenta la secreció, essent el principal responsable de l'augment dels nivells circulants d'FGF21 front el dejuni (BonDurant and Potthoff, 2018). Si el dejuni es perllonga en el temps, FGF21 pot tenir un paper regulant la gluconeogènesi, a través de l'activació del coactivador PGC1 α .

Però FGF21 també s'indueix en el fetge en resposta a una sobre alimentació. Els nivells circulants de glucosa arriben al fetge, on s'uneixen al ChREBP (*Carbohydrate-responsive element-binding protein*), provocant la translocació al nucli i la posterior activació de la transcripció d'FGF21 (Iizuka et al., 2009).

L'administració d'FGF21 recombinant en ratolins genèticament obesos tendeix a disminuir els nivells de glucosa circulants, millorant la captació de glucosa per part del fetge i, així, millorant la sensibilitat a la insulina (Berglund et al., 2009). Per altra banda, s'ha vist com el tractament amb FGF21 en els ratolins obesos provoca, també, una reducció dels nivells de TG circulants (Woo et al., 2013).

FGF21 en els teixits adiposos

El factor FGF21 ha estat descrit com un regulador important del metabolisme en el teixit adipós, essent els teixits adiposos uns dels principals teixits diana d'aquest factor. I, tot i que el principal lloc de producció i secreció d'FGF21 és el fetge, els dos tipus de teixit adipós també en són productors. En aquest cas, però, l'FGF21 secretat pels teixits

adiposos tindrà principalment efectes paracrins i autocrins. Cal destacar que, tot i estar ben establerta la producció i secreció d'FGF21 per part dels teixits adiposos en els ratolins, encara no és així en el cas dels humans on, pràcticament no s'ha trobat expressió.

A diferència del fetge, en els teixits adiposos FGF21 no actua a través del receptor nuclear PPAR α sinó que, en aquest cas, ho fa a través del receptor nuclear PPAR γ .

FGF21 en el teixit adipós blanc

L'efecte principal d'FGF21 en el teixit adipós blanc és la millora en la captació de glucosa per part dels adipòcits, a través de l'augment de l'expressió de GLUT1, entre d'altres. GLUT1 és membre de la família dels transportadors de glucosa GLUT i es caracteritza per poder ser translocat a la membrana plasmàtica sense necessitat de la senyal d'insulina. Per altra banda, però, en condicions d'obesitat, la funció d'FGF21 en el teixit adipós blanc es veu alterada. Aquest fet s'ha relacionat amb una resistència del teixit a FGF21 en condicions d'obesitat (Ge et al., 2011).

Però FGF21 també pot regular la funció endocrina del teixit adipós blanc. Per exemple, l'administració d'FGF21 a ratolins induïx l'expressió i la secreció d'adiponectina per part d'aquest teixit. Alguns dels efectes beneficiosos que s'observen en resposta a l'administració d'FGF21, com la disminució de la glucèmia, la millora de la sensibilitat de la insulina o la disminució dels triglicèrids en el fetge, es perden en ratolins deficientes per adiponectina (Lin et al., 2013).

FGF21 en el teixit adipós marró

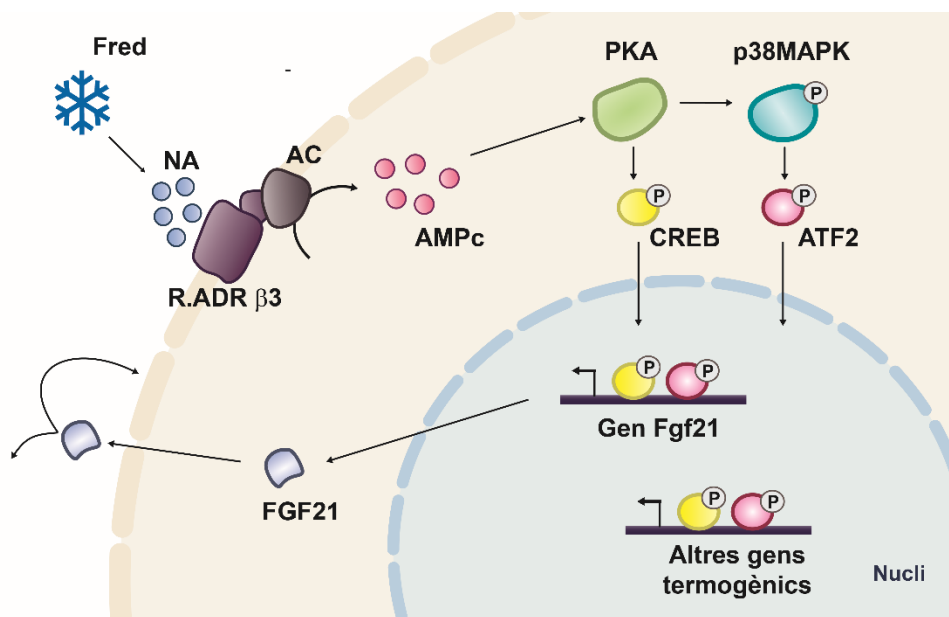


Figura 28. Regulació d'FGF21 en el teixit adipós marró. El factor FGF21 s'indueix en resposta a l'estímul adrenèrgic seguint la via clàssica d'activació d'aquest teixit, involucrant la PKA, la p38MAPK i els factors de transcripció Atf2 i Creb.

FGF21 ha estat descrita com una batoquina important, secretada pels adipòcits marrons en resposta a un estímul β_3 adrenèrgic i amb efectes autocrins reforçant l'activació de la termogènesi; procés descrit en el primer capítol d'aquesta introducció. En resposta a l'estímul de fred les neurones del teixit adipós marró alliberen noradrenalina i, aquesta, interacciona amb els receptors adrenèrgics β_3 , donant lloc al que s'anomena la via clàssica d'activació del TAM. Com a resultat d'aquesta, s'activen per fosforilació els factors de transcripció ATF2 (per part de la p38MAPK) i Creb (per part de la PKA). El promotor d'FGF21 té elements de resposta per a aquests dos factors de manera que, tant un com l'altre són capaços d'induir l'expressió del gen d'FGF21 (Figura 28) (Hondares et al., 2011).

FGF21, a més a més, té efectes autocrins reforçant l'activació de la termogènesi, així com reclutant adipòcits beix (amb fenotip termogènic) dins de dipòsits de teixit adipós blanc subcutani (Fisher et al., 2012). Aquests adipòcits beix també s'han descrit en el primer capítol d'aquesta introducció.

3.2.2. Regulació d'FGF21 durant l'exercici

Durant l'exercici físic augmenten els nivells circulants d'FGF21 tant en ratolins com en humans. En resposta a un exercici agut l'augment en els nivells circulants d'FGF21 s'ha associat amb un augment en els nivells d'àcids grassos lliures circulants. Aquest augment d'FGF21 resulta ser d'origen hepàtic, i no d'origen muscular com s'hauria previst en uns inicis. L'augment d'FGF21 en el fetge en resposta a un exercici agut podria ser degut a l'augment de la lipòlisi en el teixit adipós, observat en un exercici agut, i la senyalització d'aquests àcids grassos provinents d'aquesta lipòlisi, així com a l'estrès de reticle del fetge (Kim et al., 2013).

Però tal i com s'ha explicat en el capítol anterior, la pràctica d'exercici físic pot no ser sempre beneficiosa. En la present tesi hem volgut estudiar els nivells d'FGF21 en resposta, no a l'exercici moderat que acabem de descriure sinó, a un exercici de gran intensitat i durada com és el cas de les maratons.

3.2.3. Regulació d'FGF21 en resposta al dany mitocondrial

De la mateixa manera que FGF21 s'indueix en resposta a un estrès metabòlic (dejuni, fred,...), també s'indueix en condicions d'estrès cel·lular, com ara en l'estrès mitocondrial.

Els nivells circulants d'FGF21 es troben augmentats en pacients que pateixen alguna miopatia associada a alteracions tant en el DNA mitocondrial com en el DNA nuclear. Aquest factor mostra ser més sensible i més específic que altres marcadors utilitzats per la detecció de malalties mitocondrials (Suomalainen et al., 2011). Ja s'ha comentat en el

capítol anterior les dificultats existents per al bon diagnòstic d'aquestes malalties heterogènies.

In vitro, el tractament amb oligomicina (un inhibidor específic de l'ATP sintasa) i amb antimicina A (un inhibidor del complex III de la cadena respiratòria) indueixen l'expressió d'FGF21 en cèl·lules musculars. S'han descrit les espècies reactives de l'oxigen (ROS) com les mitjanceres d'aquest procés. Així, la generació d'elevats nivells de ROS en el mitocondri per afectacions a la cadena respiratòria, i la conseqüent activació de la p38MAPK, estan involucrades en l'activació de la transcripció del gen FGF21 en el múscul esquelètic en resposta a un dany mitocondrial (Figura 29) (Ribas et al., 2014)

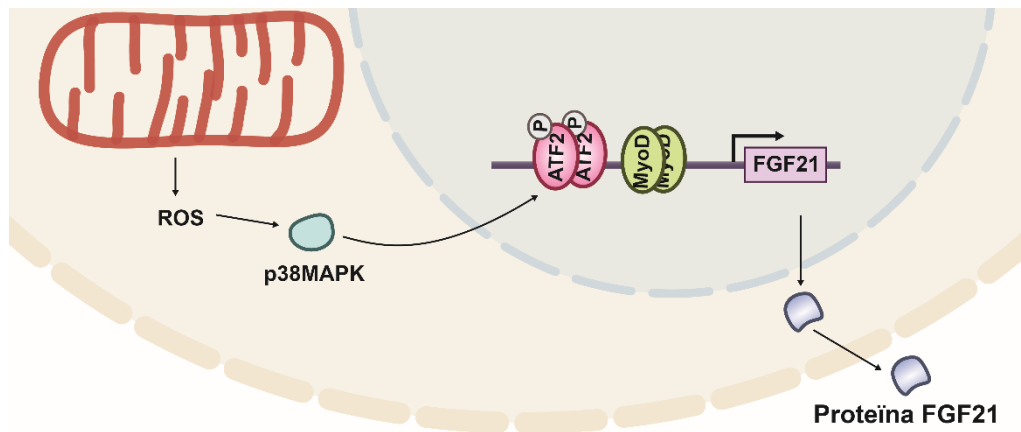


Figura 29. Regulació d'FGF21 en resposta al dany mitocondrial. Esquema representatiu de la regulació del gen FGF21 i la seva secreció al medi extracel·lular en resposta a la senyalització mitocondrial, en el context de la cèl·lula muscular. Adaptada de Ribas et al., 2014.

OBJECTIUS

L'objectiu general d'aquesta tesi fou avançar en el coneixement del rol del factor GDF15 en el metabolisme, i tingué dos apartats diferenciats:

- 1.** Determinar en models experimentals animals i cel·lulars el possible rol de GDF15 com a adipoquina marró (batoquina), establint-ne els principals mecanismes de regulació i acció.

- 2.** Determinar els canvis de GDF15 en humans en condicions fisiopatològiques associades a diferents tipus d'estrès:
 - a.** Patologia mitocondrial primària
 - b.** Naixement i desenvolupament neonatal en diferents condicions de pes al néixer
 - c.** Exercici intens en voluntaris (corredors de maratón)

MATERIALS I MÈTODES

1. Models animals

En la realització d'aquesta tesi es van utilitzar els següents models animals:

- Ratolins adults C57Bl/6J (Envigo, Cambridgeshire, Regne Unit) mantinguts a 22°C o exposats a condicions de fred (4°C) durant 1 o 21 dies. Aquests ratolins van ser sacrificats i es van guardar els teixits i els plasmes a -80°C pel seu posterior anàlisi (mRNA i proteïna).
- Ratolins adults C57Bl/6J (Envigo) injectats intraperitonealment amb 1 mg/kg de CL316,243 (17499 Cayman Chemical, MI, EUA) o amb solució salina diàriament durant 8 dies. Aquests ratolins van ser sacrificats i es van guardar els teixits i els plasmes a -80°C pel seu posterior anàlisi (mRNA i proteïna).
- Ratolins deficients pel gen KLB (B6N /129; IST12954B1) obtinguts de l'institut *Texas A&M Institute for Genomic Medicine*. Aquests ratolins van ser utilitzats per a la realització de cultius primaris d'adipòcits marrons i beix.
- Ratolins deficients pel gen FGF21 (B6N; 129S5-Fgf21tm1Lex/Mmcd) obtinguts del MMRRRC (*Mutant Mouse Regional Resource Center*) un repositori finançat per NCCR-NIH, donat per Genentech, Inc. Aquests ratolins van ser utilitzats per a la realització de cultius primaris d'adipòcits marrons i beix.
- Ratolins *swiss* (Hsd:ICR CD-1®, Envigo). Aquests ratolins es van utilitzar per a la realització de cultius primaris d'adipòcits marrons per als experiments amb medis condicionats.

Tots els ratolins es van mantenir sota un cicle de 12 h fosc / llum amb accés *ad libitum* a menjar i aigua. Els experiments es van realitzar d'acord amb la directiva 86/609/EEC del Consell de la Comunitat Europea i van ser aprovats pel Comitè ètic d'experimentació animals de la Universitat de Barcelona.

2. Cultius cel·lulars

Per a la realització dels experiments *in vitro* es van utilitzar els models cel·lulars següents:

2.1. Cultius primaris d'adipòcits

Per als cultius primaris d'adipòcits es van obtenir cèl·lules de l'estroma vascular de teixit adipós marró i de teixit adipós blanc inguinal de ratolins de 3 setmanes d'edat; deficients pel gen KLB i deficients pel gen FGF21, així com dels seus germans control (Quesada-López et al., 2016). La fracció de l'estroma vascular es va obtenir per digestió amb col·lagenasa (Taula 2) i posterior centrifugació.

Taula 2. Solucions de digestió utilitzades pels cultius primaris d'adipòcits marrons i beix

Solució de digestió pel cultiu d'adipòcits marrons		Solució de digestió pel cultiu d'adipòcits beix	
Aigua		DMEM F12	
Hepes ph7,4	100 mM	Fungisona	1%
NaCl	123 mM	Biotina	0,016 mM
KCl	5 mM	Àcid pantotènic	0,018 mM
CaCl ₂	3 mM	Àcid ascòrbic	100 µM
Glucosa	5 mM	BSA	2%
BSA	1,5%	Col·lagenasa	2 mg/mL
Col·lagenasa A	1 mg/mL		

2.1.1. Cultius primaris d'adipòcits marrons

Les cèl·lules precursors es van sembrar en un medi DMEM/F12 (1:1) (*Dulbecco's modified Eagle's medium/Ham's F12 medium*) suplementat amb 10% de sèrum boví fetal (FBS) i 1% de fungisona durant 24h, moment en que es va canviar pel medi de creixement (Taula 3). Al cap de 4 dies es va renovar el medi i es va deixar uns 3-4 dies més, quan, segons la morfologia, més del 90% de les cèl·lules estaven diferenciades a adipòcits marrons.

Taula 3. Medi pel cultiu primari d'adipòcits marrons

Medi de creixement	
DMEM/F12	
FBS	10%
Fungisona	1%
Insulina	20 nM
T3	2 nM
Àcid ascòrbic	100 µM

2.1.2. Cultius primaris d'adipòcits beix

Les cèl·lules precursors aïllades es van sembrar i es van fer créixer en el medi de creixement durant 4-5 dies, moment en el que es va canviar pel medi de diferenciació (Taula 4). Les cèl·lules es van utilitzar 2-3 dies més tard, quan, segons la morfologia, més del 90% de les cèl·lules estaven diferenciades a adipòcits beix.

Taula 4. Medis de cultiu utilitzats en els cultius primaris d'adipòcits beix

Medi de creixement		Medi de diferenciació	
DMEM/F12		Medi de creixement	
Fungisona	1%	Insulina	850 nM
NCS (Sèrum de vedells nounats)	10%	Dexametasona	35 nM
Biotina	0,016 mM	Rosiglitasona	10 µM
Àcid pantotènic	0,018 mM	T3	3 µM
Àcid ascòrbic	100 µM		

Els cultius primaris d'adipòcits marrons i beix es van mantenir a 37°C i al 7% de CO₂ en tot moment. Aquests adipòcits van ser tractats amb 1 µM del compost CL316,243 (Cayman Chemical) durant 24h.

2.2. Cultius d'adipòcits marrons immortalitzats.

Els adipòcits marrons immortalitzats de ratolins C57BL/6J van ser cedits per A.M. Valverde (IIB, CSIC, Espanya). El manteniment dels cultius dels preadipòcits es va fer amb DMEM suplementat amb el 10% d'FBS, l'1% de la barreja (1:1) de penicil·lina/estreptomicina (P/S) i 20 mM d'HEPES i, en tot moment es van mantenir a 37°C i al 7% de CO₂.

Per a la realització dels experiments es van sembrar unes 100.000 cèl·lules per pou (plaques de 12 pous) i es van deixar créixer en el medi de creixement durant 24-48h fins a obtenir un 70-80% de confluència. Arribades a aquesta confluència, es van diferenciar mitjançant l'addició del medi de diferenciació, que vam mantenir durant 48h. Finalment, després de les 48h es va tornar al medi creixement durant 4-5 dies (renovant el medi cada 2 dies) fins a la total diferenciació dels adipòcits (Taula 5).

Els adipòcits marrons diferenciats es van tractar amb 0,5 µM de noradrenalina (NA), 1 mM de dibutiril AMPc, 20 µM d'H89, 10 µM de SB202190, 10 µM de GW6471, 1 µM de GW7647, 100mM de proteïna FGF21 recombinant o 0.5-1000 ng/mL de proteïna GDF15 recombinant de ratolí, segons l'experiment. Tots els reactius van ser obtinguts de Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EUA), excepte l'FGF21 recombinant (Phoenix Pharma, Créteil, França) i el GDF15 recombinant (R&D Systems, MN, EUA).

Taula 5. Medis de cultiu utilitzats per al cultiu d'adipòcits marrons immortalitzats

Medi de creixement		Medi de diferenciació	
DMEM		Medi de creixement	
FBS	10%	Dexametasona	500 nM
Penicil·lina / estreptomicina (P/S)	1%	Rosiglitasona	1 μ M
Hepes	2%	Indometacina	125 μ M
Insulina	20 nM	IBMX (3-isobutil-1-metilxantina)	500 μ M
T3	1,08 nM		

2.3. Cultius d'adipòcits marrons HIB-1B

Els adipòcits marrons murins HIB-1B (proveïts per P. Puigserver, Dana-Farber Cancer Institute, Harvard Medical School, Boston, MA, USA) van ser cultivats en medi DMEM F12 suplementat amb FBS inactivat per calor al 10% i amb el còctel P/S al 1%. En tot moment es van mantenir a 37°C i al 5% de CO₂. Les cèl·lules HIB-1B es van mantenir en el seu estat de preadipòcits.

Per als experiments d'activitat de promotor es van sembrar 15.000 cèl·lules per pou (plaques de 24 pous). Al cap de 24h les cèl·lules van ser transfectades transitòriament amb el constructe pGL3-GDF15, amb el constructe pRL-CMV i, quan s'indiqui, amb el constructe SR α -PKA. Finalment, les cèl·lules es van incubar durant 48 hores amb dibutiril AMPc 1 mM (Sigma-Aldrich) i es va mesurar l'activitat del promotor (Veure més endavant).

2.4. Cultiu d'adipòcits SGBS

Les cèl·lules SGBS humanes (Wabitsch et al., 2001) es van diferenciar a adipòcits beix seguint el protocol descrit a la literatura (Yeo et al., 2017). El manteniment dels cultius sense diferenciar es va fer amb DMEM/F12 suplementat amb el 10% de FBS inactivat per calor, 1% de P/S, 32 μ M de biotina i 16 μ M d'àcid pantotènic. En tot moment es van mantenir a 37°C i al 5% de CO₂.

Per a la realització dels experiments es van sembrar les cèl·lules amb el mateix medi de manteniment fins a obtenir un 100% de confluència en els pous. Una vegada aconseguida la confluència de les cèl·lules es van començar a diferenciar amb el medi de diferenciació 1, el qual es va mantenir durant 7 dies (renovant el medi a la meitat). Passats els 7 dies es va canviar al medi de diferenciació 2 durant 7 dies més (també renovant el medi a la meitat) fins a aconseguir una diferenciació superior al 90% (Taula 6).

Taula 6. Medis de diferenciació pels cultius d'adipòcits humans SGBS

Medi de diferenciació 1		Medi de diferenciació 2	
DMEM/F12		DMEM F12	
P/S	1%	P/S	1%
Biotina	32 µM	Biotina	32 µM
Àcid pantotènic	16 µM	Àcid pantotènic	16 µM
Insulina	20 µM	Insulina	20 µM
Cortisol	100 nM	Cortisol	100 nM
T3	0,2 nM	T3	0,2 nM
Transferrina	1 mg/100mL	Transferrina	1 mg/100mL
Dexametasona	25 nM		
IBMX	500 µM		
Rosiglitasona	2 µM		

Les cèl·lules SGBS es van tractar, una vegada diferenciades, amb 1 mM de dibutiril AMPc (Sigma-Aldrich) durant 6 i 24h.

2.5. Cultius cel·lulars de miotubs

2.5.1. Miotubs de ratolí C2C12

Els miotubs C2C12 (ATCC; LGC Standards S.L.U, VA USA) es van fer créixer en medi DMEM suplementat amb FBS al 10%. A aquests miotubs se'ls va induir el procés de diferenciació, canviant l'FBS pel HS (*Horse serum*) al 2%, quan presentaven una confluència del 80%. Es van deixar diferenciant durant 4 dies.

2.5.2. Miotubs humans LHCN-M2

Cèl·lules humanes mioblàstiques (Zhu et al., 2007) cedides pel Dr. W. Wright (*University of Texas South western Medical Center, Dallas, USA*). Els mioblasts es van deixar créixer en el medi de creixement fins a obtenir el 70-80% de confluència en els pous de les plaques de cultiu, moment en el que es va canviar pel medi de diferenciació 1. Aquest medi es va mantenir durant un parell de dies i es va canviar pel medi de diferenciació 2 durant 5-8 dies més i, fins a un total de 7 o 10 dies posteriors a la inducció de la diferenciació (Taula 7).

Els cultius de miotubs es van tractar amb antimicina A (un inhibidor del complex III de la cadena respiratòria) 10 µM i amb oligomicina (un inhibidor de la ATP sintasa) 0,1 µM. Concentracions que es va veure que no causaven una citotoxicitat significativa en els miotubs (Ribas et al., 2014). Quan s'indica, també es van tractar amb Trolox 2 mM

(derivatiu soluble de la vitamina E) i amb inductors coneguts d'estrès de reticle; taspigargina 1 μ M i tunicamicina 1 μ M (Sigma-Aldrich).

Taula 7. Medis utilitzats pel cultiu de miotubs humans LCHN-M2

Medi de creixement		Medi de diferenciació 1		Medi de diferenciació 2	
DMEM		DMEM		DMEM	
FBS	15%	FBS	0,5%	FBS	0,5%
P/S/Fungisona	1%	P/S/F	1%	P/S/F	1%
Hepes	1 M	Hepes	1 M	Hepes	1 M
Sulfat de Zinc	60 μ g/mL	Insulina	1 mg/mL	Dexametasona	55 μ g/mL
Vitamina B12	14 mg/mL	Apo-transferrina	10 mg/mL		
Dexametasona	55 μ g/mL	Dexametasona	55 μ g/mL		
HGF (<i>human hepatocyte growth factor</i>)	50 μ g/mL				
FGF (<i>Fibroblast growth factor</i>)	10 μ g/mL				

2.6. Cultiu de macròfags RAW 264.7

Els cultius de macròfags RAW 264.7 (ATCC; LGC Standards S.L.U, VA USA) es van mantenir en medi DMEM suplementat amb FBS inactivat per calor al 10% i la barreja de penicil·lina i estreptomicina (P/S) al 1%. A diferència dels altres cultius utilitzats en aquesta tesi no es va utilitzar tripsina per al manteniment dels macròfags; aquesta afecta a les proteïnes de membrana, molt importants en el cas dels macròfags. Les cèl·lules es van aixecar amb l'ajuda d'un raspador. Els cultius es van mantenir al 5% de CO₂ i a 37°C.

Per als experiments es van sembrar 250.000 cèl·lules/pou (plaques de 12 pous) en medi de manteniment. Quan les cèl·lules van arribar al 80% de confluència es va reduir la quantitat de FBS inactivat (iFBS), passant del 10% al 1%. A partir d'aquest punt, i fins al final, el medi utilitzat va ser DMEM suplementat amb 1% de P/S i 1% de iFBS. Passades 12h del canvi de medi es van activar els macròfags als diferents fenotips. Per a l'activació a M1 es van tractar amb 60 ng/mL de LPS (Sigma-Aldrich) durant 12h, mentre que per a l'activació a M2 es van tractar amb 40 ng/mL de IL4 (PeproTech EC, Rocky Hill, NJ, USA), també durant 12h. Passades les 12h d'activació es portaren a terme els tractaments amb 0-100 ng/mL de GDF15 recombinant (R&D Systems) durant 12h més.

3. Transfecció transitòria i mesura de l'activitat del promotor

En aquesta tesi la transfecció transitòria es va utilitzar per tal d'incorporar els plasmidis amb els diferents promotors per mesurar l'activitat del promotor de GDF15. Es va utilitzar la Lipofectamina 2000 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), seguint les indicacions de la casa comercial.

Els plasmidis utilitzats foren:

- pGL3-GDF15: Gen de la *firefly luciferase* sota el control del promotor de GDF15. Clonat durant la tesi (descriu més endavant).
- pRL-CMV: Gen de la *renilla luciferase* sota el control d'un promotor constitutivament actiu (el promotor del citomegalovirus, CMV) (Promega).
- SR α -PKA: plasmidi amb una forma constitutivament activa de la PKA (Muramatsu et al., 1989).

Les transfeccions transitòries es van realitzar en plaques de cultiu de 24 pous. Quan a més dels plasmidis amb els promotors es va transfectar un plasmidi d'expressió (el constructe SR α -PKA) es va utilitzar la relació 5:1. D'aquesta manera, per pou de placa de 24 pous, es va transfectar 0,5 μ g de pGL3-GDF15, 0,1 μ g de SR α -PKA i 1ng de pRL-CMV.

En els estudis d'assaig de promotor, l'activitat de la luciferasa *firefly* es va normalitzar amb les mesures d'activitat de la luciferasa *renilla* per tal d'eliminar la variabilitat deguda a les diferents eficiències de transfecció. Les activitats de les dues luciferases es van mesurar en el luminòmetre *Turner Designs Luminometer (TD20/20)* utilitzant el sistema *Dual Luciferase Reportes assay System* (Promega).

4. Experiments amb medis condicionats

Es van obtenir cèl·lules de l'estroma vascular de teixit adipós marró de ratolins *swiss* de 3 setmanes d'edat (Envigo), tal i com s'ha explicat en l'apartat de cultius primaris d'adipòcits marrons i beix. 48h abans de recollir les cèl·lules es va eliminar l'FBS del medi. Es van recollir els medis i es van guardar a -20°C.

Paral·lelament, es van sembrar macròfags RAW 264,7, també tal i com s'ha explicat anteriorment. En aquest cas, només es van activar macròfags al fenotip M1. Passades les 12h d'activació es van canviar els medis del cultiu pels medis dels adipòcits marrons guardats a -20°C i, amb o sense tractament amb un anticòs (2 μ g/mL) contra GDF15 (sc-46248, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) o amb un anticòs inespecífic (anti-rabbit IgG, Boehringer Mannheim, Alemanya). Alguns pous es van mantenir amb el medi normal dels macròfags per ser utilitzats com a controls.

5. Immunofluorescència

Per a la immunofluorescència es van sembrar adipòcits marrons immortalitzats sobre cobreobjectes rodons tractats amb poli-lisina. Es van fer créixer i es van diferenciar com s'ha explicat a l'apartat de cultiu d'adipòcits marrons immortalitzats, i es van tractar amb 1 mM de dibutiril AMPc (Sigma Aldrich) durant 6 i 24h.

La immunofluorescència es va dur a terme seguint els següents passos:

- Fixació de les cèl·lules: Paraformaldehid al 4% en PBS durant 20-30 minuts a 4°C. Seguida de rentats amb PBS.
- Permeabilitació: Tritó X-100 al 0,1% en PBS durant 15 minuts a temperatura ambient. Seguida de rentats.
- Bloqueig: Albúmina sèrica bovina (BSA) al 2% i tritó al 3% en PBS durant 1 hora a temperatura ambient.
- Incubació amb l'anticòs primari: Anticòs contra GDF15 (sc-46248, Santa Cruz Biotechnology) en BSA al 1% i tritó al 0,3% en PBS. Durant la nit a 4°C i posteriors rentats.
- Incubació amb l'anticòs secundari: Anticòs Alexa Fluor 488 contra cabra (Life Technologies) en BSA al 1% i tritó al 0,3% en PBS. Incubació durant 1 hora a temperatura ambient i posteriors rentats. A partir d'aquest pas, es realitza tot el procés en condicions de foscor.
- Tinció dels nuclis: 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Life Technologies). Dilució 1:10.000 en PBS. Incubació durant 5 minuts a temperatura ambient i posteriors rentats.
- Muntatge: *Mowiol* (EMD Millipore, Billerica, MA, USA). Deixar 1-2 dies a 4°C i guardats a -20°C.

Les imatges es van adquirir amb un microscopi confocal de fluorescència Leica TCS-SP5 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanya). Es van adquirir plans cada 0,5 µm en temps d'exposició equivalents i es van analitzar les imatges amb el programa ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA). Les imatges, després, van ser processades amb Adobe Photoshop CS6 (Adobe Systems, San José, CA, USA); es van aplicar els mateixos canvis en totes les imatges comparades.

6. Aïllament d' RNA i PCR quantitativa en temps real

Les mesures dels canvis dels nivells d'expressió dels gens d'interès es van realitzar mitjançant la quantificació de l'expressió gènica per PCR quantitativa a temps real, seguint el següent procediment:

6.1. Purificació d'RNA mitjançant columnes d'afinitat

Per a la purificació del RNA a partir dels teixits de ratolí i de les línies cel·lulars descrites (exceptuant el teixit muscular i les línies de miotubs) es va emprar el kit *NucleoSpin RNA* (Macherey-Nagel, Düren, Alemanya) seguint el protocol establert en el kit. Un cop l'RNA esta retingut a la membrana es fa el tractament amb la DNAsa (proporcionada en el kit), per finalment eluir l'RNA amb aigua.

6.2. Purificació d'RNA mitjançant fenol-cloroform

Aquest ha estat el mètode utilitzat en el cas del teixit muscular esquelètic i dels cultius de miotubs; amb aquest mètode obtenim una lisi més eficient que amb el sistema de columnes, degut a la consistència molt més fibrosa del teixit muscular. Per a aquest mètode es va utilitzar el *TriPure Isolation Reagent* (Roche), seguint les indicacions de la casa comercial.

Un cop obtingut l'RNA resuspès en aigua, es va eliminar la possible contaminació amb DNA genòmic aplicant el protocol de *DNA-free™ kit, DNase treatment and Removal Reagents* (Ambion®, Applied Biosystems).

6.3. Transcripció reversa

L'RNA purificat es va transcriure a cDNA a partir de 500 ng de mostra d'RNA utilitzant els reactius del kit de cDNA *TaqMan Reverse transcription reagents, N8080234* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Com a encebadors de la reacció es van utilitzar els hexàmers de composició aleatòria continguts en el kit, de manera que la barreja de reacció utilitzada va ser:

- TaqMan RT Buffer: 1x
- MgCl₂: 5,5 mM
- Barreja de deoxinucleòtids (dNTPs): 500 µM de cada dNTP
- *Random Hexamers*: 2,5 µM
- Inhibidors d'RNAses: 0,4 U/µL
- Transcriptasa reversa *MultiScribe*: 1,25 U/µL

6.4. PCR quantitativa en temps real

Els nivells de trànscrip van ser determinats per PCR quantitativa en temps real utilitzant l'aparell de PCR en temps real 7500 (Applied Biosystems) i mitjançant sondes TaqMan, també obtingudes d'Applied Biosystems (Taula 8). Aquesta tècnica quantifica a temps real el producte que es genera durant la reacció gràcies a l'activitat d'un fluoròfor, el qual emet una quantitat de fluorescència proporcional al producte específic present en cada moment i que depèn també de la quantitat específica de cadascun dels cDNAs utilitzats com a motlle. Aquest producte només es pot valorar mitjançant un termociclador prou sensible, per tal de poder detectar la fluorescència emesa pel fluoròfor, després d'haver estat alliberat pel seu *quencher* per acció de la polimerasa *TaqMan*.

La barreja de reacció utilitzada en aquest cas va ser:

- 10 µL de *Platinum qPCR Super-Mix-UDG with ROX* (Applied Biosystems)
- 1 µL de la sonda *TaqMan Gene Expression Assay* (Applied Biosystems)
- 8 µL d'aigua
- 1 µL de cDNA

Taula 8. Sondes TaqMan utilitzades pels experiments de PCR quantitativa a temps real

Espècie	Gen	Referència	Espècie	Gen	Referència
Ratolí	<i>Adrb3</i>	Mm00442669_m1	Ratolí	<i>Mrc1</i>	Mm00485148_m1
Ratolí	<i>Arg1</i>	Mm00475988_m1	Ratolí	<i>Ppargc1a</i>	Mm00447183_m1
Ratolí	<i>Ccl2</i>	Mm00441242_m1	Ratolí	<i>Slc2a1 (Glut1)</i>	Mm00441480_m1
Ratolí	<i>Clec10a</i>	Mm00546124_m1	Ratolí	<i>Tnf</i>	Mm00443258_m1
Ratolí	<i>Dio2</i>	Mm00515664_m1	Ratolí	<i>Ucp1</i>	Mm00494069_m1
Ratolí	<i>Fabp4</i>	Mm00445880_m1	Humà	<i>18S</i>	Hs99999901_s1
Ratolí	<i>Fgf21</i>	Mm00840165_g1	Humà	<i>FGF21</i>	Hs00173927_m1
Ratolí	<i>Gdf15</i>	Mm00442228_m1	Humà	<i>GDF15</i>	Hs00171132_m1
Ratolí	<i>Grp78</i>	Mm00517691_m1	Humà	<i>GRP78</i>	Hs99999174_m1
Ratolí	<i>Il6</i>	Mm00446191_m1	Humà	<i>UCP1</i>	Hs00222453_m1
Ratolí	<i>Klb</i>	Mm00473122_m1			

La sonda 18S rRNA reconeix i permet l'amplificació de la subunitat 18S ribosomal i, s'utilitza com a control endogen o gen de referència, ja que al ser la forma d'RNA majoritària en la cèl·lula i la quantitat del qual teòricament és invariable, serveix per a

corregir possibles errors de càrrega a l'hora d'haver realitzat la retrotranscripció. Per altra banda, tot i ser la sonda humana, també és capaç de reconèixer el 18S de ratolí, de manera que ens serveix de gen de referència tant pels gens humans com pels gens de ratolí.

Els nivells d'mRNA de cada gen d'interès es van normalitzar amb els nivells del gen de referència, en el nostre cas l'rRNA 18S. Les dades es van analitzar utilitzant el mètode comparatiu ($2^{-\Delta CT}$).

7. Western blot

Les mesures dels canvis a nivell de proteïna intracel·lular es van realitzar mitjançant la tècnica del western blot; en algun cas també es va utilitzar per la detecció de proteïna el medi de cultiu. Amb aquesta tècnica podem detectar la proteïna desitjada mitjançant la utilització d'anticossos generats contra epítops concrets de la proteïna d'interès, podent-la distingir enmig de tot el conjunt de proteïnes (obtingudes a partir d'un lisat cel·lular), que es separen segons el seu pes molecular mitjançant una electroforesi en un gel de poliacrilamida/SDS i que es transfereixen a una membrana de PVDF.

7.1. Obtenció d'extractes proteics a partir de cultius cel·lulars i de mostres de teixit

Els extractes de cèl·lules i teixits es van preparar per homogeneïtzació en Tris HCl 50 mM (pH 7.4), NaCl 150 mM, 1% NP40-Igepal, SDS al 0,1%, EDTA 2 mM, ortovanadat 2 mM, β -glicerofosfat 40 mM, PMSF 1 mM, i un còctel d'inhibidors de proteases (Roche Diagnostics, Basilea, Suïssa).

La proteïna total es va mesurar utilitzant el kit d'assaig de proteïna BCA (àcid bicinconínic) de *Pierce*TM (Waltham, MA, USA), seguint les indicacions del kit. Les absorbàncies es van mesurar mitjançant el lector de plaques ELISA; *Benchmark Plus microplate spectrophotometer* (BIO-RAD).

7.2. Electroforesi, transferència i immunodetecció

- Preparació de les mostres: addició del volum necessari per a assolir una determinada quantitat de proteïna i 1/5 parts de tampó de ruptura (Tris-HCl 100 mM, pH 6,8, glicerol 20%, β -mercaptoetanol 2%, SDS 2% i blau de bromofenol 0,1%).
- Electroforesi: gels del 12% de poliacrilamida en presència de dodecil sulfat sòdic (SDS).

- Transferència: transferència de les proteïnes del gel a la membrana de PVDF (*Immobilon-P polyvinylidene difluoride membranes*) (GE Healthcare, Little Chalfont, Regne Unit).
- Immunodetecció: Incubació de les membranes amb anticossos primaris específics per GDF15 (sc-46248, Santa Cruz Biotechnology) seguit de rentats i de la incubació amb l'anticòs secundari específic de cabra conjugat amb una peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology). La detecció es va fer a través de la incubació amb el substrat quimioluminiscent de la peroxidasa (EMD Millipore) en l'aparell *LAS 3000 Imager* (Fujifilm, Tòquio, Japó).

Les anàlisis densitomètriques es van realitzar utilitzant el programa Multi Gauge V3.0 (Fujifilm).

8. Quantificació de proteïnes solubles

Els nivells de GDF15 en els medis de cultiu cel·lular, així com en els plasmes, es van mesurar mitjançant kits ELISA específics per ratolí i per humans de *R&D systems*. De la mateixa manera, els nivells d'FGF21 secretat es van mesurar amb els kits per ratolí i per humans de Millipore, en tots els casos seguint els protocols dels kits. Aquests kits presenten un anticòs monoclonal específic per la proteïna secretable en qüestió unit als pous de la placa, on s'hi afegeix la mostra a analitzar. Sobre de la mostra s'hi addiciona un altre anticòs, també específic per la proteïna en qüestió, unit a un enzim, que quantifiquem afegint el substrat de l'enzim.

Per altra banda, per a la detecció de la secreció de les citocines TNF α i MCP1 es va emprar el sistema de MILLIPLEX MAP (MADCYMAP-72K, Merck-Millipore, Billerica, MA, USA), basat en microesferes magnètiques amb fluorocroms conjugades a anticossos específics per cada citocina, de manera que permet la detecció de diferents citocines en una mateixa mostra, mitjançant la detecció de la fluorescència emesa per les microesferes després de la seva excitació per un làser amb l'aparell Luminex100ISv2.

9. Clonació

En el moment de la realització dels estudis d'assaig d'activitat del promotor de GDF15 no existia comercialment aquest promotor clonat en un vector davant de la *firefly luciferase*, sistema que volíem per tal de dur a terme els estudis d'activitat del promotor. Per a aquest motiu, es va obtenir el vector comercial S704293 pLightSwitch_Prom (SwitchGear Genomics, La Hulpe, Bèlgica), que consistia en un plasmidi que contenia un fragment del promotor de GDF15 davant d'una *renilla luciferase* i es va aïllar el fragment del promotor

per tal de clonar-lo en un vector pGL3-basic (contenint el gen de la luciferasa *firefly*) (Figura 30) (Promega).

El vector S704293 pLightSwitch_Prom i el vector pGL3-Basic es van digerir amb els enzims de restricció Bjl II i Mlu I (Roche) i es van fer córrer en un gel d'agarosa. Es van extreure la banda del promotor de GDF15 (insert) i la banda del vector pGL3-Basic obert utilitzant el kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-Up (Macherey-Nagel). Posteriorment, es va realitzar la lligació dels dos fragments utilitzant la DNA lligasa T4 (Promega).

Amb el producte de la reacció de lligació es van transformar cèl·lules bacterianes d'*Escherichia coli* competents (capaces d'incorporar DNA exogen, dut a terme mitjançant xoc tèrmic), per tal d'amplificar el nou plasmidi.

9.1. Miniprep i comprovació de la colònia

Les minipreps es van realitzar per tal d'aconseguir purificar quantitats petites de DNA plasmídic i comprovar que les colònies de bacteris havien estat transformades amb el vector pGL3-basic, contenint el fragment del promotor de GDF15. Per a les minipreps es va utilitzar el kit QIAGEN *Plasmid Mini kit* (Qiagen) i es va seguir el protocol establert en el kit.

Per a la comprovació del plasmidi, les minipreps resultants es van digerir amb els mateixos enzims de restricció utilitzats en el procés de la clonació i es van fer córrer en un gel d'agarosa, per tal de visualitzar els fragments. La miniprep que va donar positiva tant per l'insert com pel vector pGL3 obert es va comprovar, a més a més, per seqüenciació. El kit de seqüenciació utilitzat va ser el kit BidDye terminator v3.1 sequencing (Applied Biosystems) i es va portar a seqüenciar a la Unitat de Genòmica dels serveis Científicotecnics de la UB (CCiT).

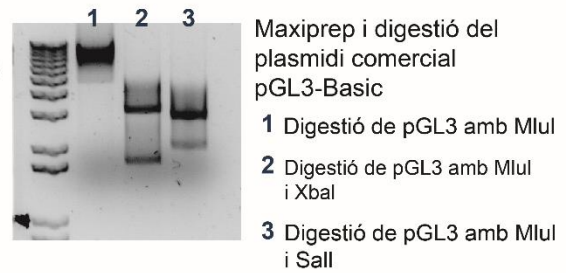
9.2. Maxiprep

Una vegada comprovat el plàsmid clonat (en aquest cas pGL3-GDF15) es va realitzar una maxiprep per tal d'obtenir una quantitat suficient d'aquest per a poder-lo transfectar transitòriament als preadipòcits en cultiu. Les maxipreps es van realitzar amb el kit *QIAfilter Plasmid Maxi kit* (Qiagen), seguint el protocol del kit.

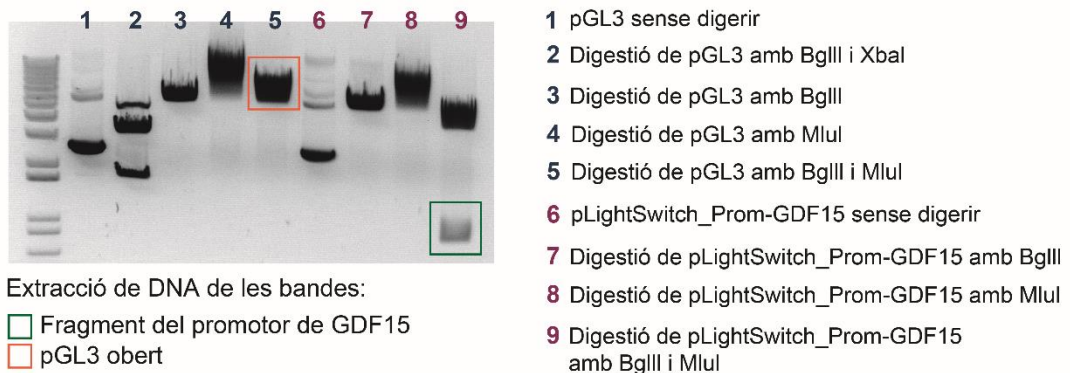
A. Comprovació dels plasmidis pLightSwitch_Prom



B. Comprovació del plasmidi pGL3-Basic

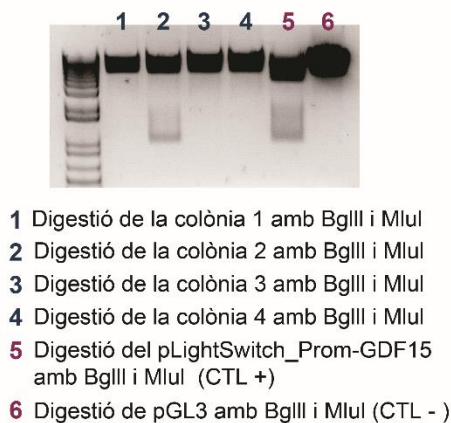


C. Digestió i extracció del DNA de les bandes del fragment de promotor i del vector pGL3 obert



D. Comprovació de la reacció de lligació

Minipreps de les 4 colònies obtingudes de la reacció de lligació



E. Comprovació final de la maxiprep

Maxiprep de la colònia positiva pel fragment de promotor de GDF15 i pel vector pGL3 obert (colònia 4)

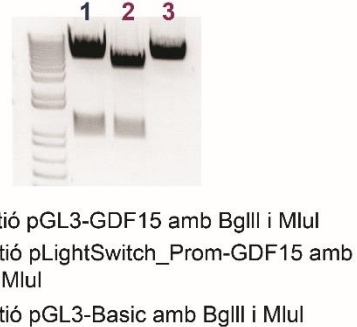


Figura 30. Procés de clonació del promotor de GDF15 en el vector pGL3-Basic.

10. Adipòcits marrons GDF15 KD

Es va bloquejar l'expressió de GDF15 en adipòcits marrons utilitzant lentivirus amb un shRNA contra GDF15 (sc-39799-V, Santa Cruz Biotechnology) i amb un shRNA inespecífic (sc-108080, Santa Cruz Biotechnology)(no reconeix cap mRNA del genoma) com a control.

Els adipòcits marrons immortalitzats no diferenciats van ser infectats en condicions de subconfluència pels diferents lentivirus seguint el protocol de Santa Cruz Biotechnologies. Per tal d'ajudar a la infecció del lentivirus es va utilitzar *polybrene* (Santa Cruz Biotechnologies) a una concentració de 5 µg/mL. Com a control de la infecció es va utilitzar un tercer lentivirus amb la proteïna fluorescent GFP (sc-108084, Santa Cruz Biotechnologies). Es va observar a través d'un microscopi de fluorescència la infecció amb el lentivirus de GFP i es va assumir la mateixa infecció pels altres dos (lentivirus-shGDF15 i lentivirus shCTL) ja que en tots els casos es tractava de les mateixes partícules víriques.

Els adipòcits infectats es van amplificar per poder ser sembrats. D'aquests es va recollir proteïna i els medis de cultiu. En l'apartat de resultats es pot veure la comprovació de la disminució de GDF15 a nivell de proteïna d'aquestes cèl·lules.

11. Estudis en humans

11.1. Estudi durant el desenvolupament neonatal i infantil

11.1.1. Població d'estudi:

La cohort de l'estudi va consistir en 103 infants [70 AGA (49% nenes) i 33 SGA (48% nenes)] provinents de dos estudis longitudinals anteriors [estudi 1 (de Zegher et al., 2012a) i estudi 2 (Díaz et al., 2017)], reclutats fins al setembre del 2009 (estudi 1) i fins al desembre del 2014 (estudi 2). Per a aquest estudi centrat en l'anàlisi dels nivells de GDF15 circulants, els criteris d'inclusió específics van ser els següents: 1) embaràs individual sense complicacions maternes, 2) origen caucàsic, 3) Naixement a l'Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, entre les setmanes 37-42 d'embaràs i pes al néixer entre 2,9 i 3,8 Kg pels AGA (rang -1,1 i + 1,1 SD) i entre 1,9 i 2,6 Kg pels SGA (per sota de -2 SD), 4) únicament lactància materna o de fórmula durant els primers 4 mesos, 5) assoliment espontani de pes i llargada, definit com $Z\text{-score} > 2.0$ a l'edat d'1 any (Clayton et al., 2007), 6) Disponibilitat de sèrum del cordó umbilical i mostres de sang a edats de 4, 12 i 24 mesos per mesurar GDF15, 7) Informe del consentiment en català i castellà obtingut durant el tercer trimestre d'embaràs. A la vegada, els criteris d'exclusió foren: Hipertensió, preclàmpsia, diabetis gestacional, abús d'alcohol o drogues, malformacions congènites i

complicacions durant el part. La freqüència de parts per cesària va ser similar en els subgrups AGA i SGA (19% i 27%, respectivament ($p > 0,05$)). Finalment, el 13% dels AGA va ser alimentat per llet de fórmula, mentre que en el cas dels SGA ho van ser un 45% dels infants, durant els 4 primers mesos de vida.

També es van mesurar els nivells de GDF15 circulants en 11 nounats sans AGA (mitjana de pes al naixement de 3,3 Kg) d'aproximadament unes 36h de vida, i en 18 dones embarassades sense complicacions durant l'embaràs (a les 35 setmanes d'embaràs), que posteriorment van donar llum a infants AGA sans (mitjana de pes al naixement de 3,3 Kg). Aquestes embarassades i aquests nounats havien estat inclosos prèviament en un altre estudi longitudinal (de Zegher et al., 2012b). Per últim, es van mesurar els nivells de GDF15 en una cohort d'adults sans [$n=18$ (8 dones), mitjana d'edat de $41,4 \pm 0,7$ anys, índex de massa corporal (IMC) de $25 \pm 0,5$ Kg/m², (mitjanes \pm SEM)].

11.1.2. Obtenció de les mostres:

Les mostres de sang obtingudes al moment del naixement es van extreure del cordó umbilical (abans de la separació de la placenta). Les mostres de sang als 4, 12 i 24 mesos es van extreure en dejú.

11.1.3. Paràmetres mesurats:

L'edat gestacional es va calcular d'acord amb l'última menstruació i es va confirmar amb l'ecografia del primer trimestre (~10 setmanes). El pes i la llargada es van mesurar al naixement, als 4 mesos, als 12 mesos i als 24 mesos d'edat.

La glucosa sèrica es va mesurar amb el mètode d'oxidació de la glucosa. Els lípids, la insulina i l'IGF-1 van ser mesurats per immunoquimioluminiscència (DPC IMMULITE 2500, Siemens, Germany). L'adiponectina d'elevat pes molecular (*HMW-adiponectin*) va ser mesurada per ELISA (R&D Systems).

La composició corporal es va avaluar a l'edat de 15 dies i als 4, 12 i 24 mesos, mitjançant absorciometria de raigs X d'energia doble (DXA) amb un Lunar Prodigy acoblat al programa Lunar (versió 3.4 / 3.5; Lunar Corp, Madison, WI), adaptat per infants; les mesures es van realitzar durant el somni espontani abans de l'alimentació, i es va determinar el greix corporal, la massa muscular i el contingut mineral ossi (BMC).

Tots aquests paràmetres van ser mesurats a l'Hospital Sant Joan de Déu. Al laboratori vam mesurar els nivells circulants de GDF15, com s'ha descrit anteriorment.

11.2. Estudi dels efectes de l'exercici intens (Estudi marató Barcelona 2017)

11.2.1. Població d'estudi:

L'estudi va ser dissenyat per analitzar els canvis en els nivells de GDF15 i d'FGF21 en atletes no professionals abans i després de la cursa de la marató de Barcelona realitzada el 17 de març de 2017. El comitè ètic local va aprovar l'estudi i tots els participants van proporcionar un consentiment informat per escrit. La mostra de l'estudi incloïa 18 atletes masculins (mitjana d'edat \pm SEM: 41,7 \pm 1,0 anys). La mitjana d'anys d'entrenament (rang interquartil, IQR) era de 7 (5-11) anys i la mitjana d'hores d'entrenament setmanal (IQR) de 6 (5-8) h/ setmana. La mitjana del temps de realització de la cursa (IQR) (hores : minuts: segons) va ser de 3:32:44 (3:18:50 – 3:51:46).

Amb finalitats comparatives, també es van mesurar els nivells circulants de GDF15 en voluntaris masculins sans amb mitjana d'edat similar i amb perfil de comportament sedentari (n=19, mitjana d'edat \pm SEM: 41,37 \pm 0,71 anys).

11.2.2. Obtenció de les mostres:

Es van obtenir mostres de sang de 10 mL de la vena avantcubital en 3 moments diferents en cada un dels atletes: 1) 48h abans de la realització de la cursa, 2) al moment de la finalització (dins dels 10 minuts després d'haver completat la cursa i abans de beure qualsevol líquid i de buidar la bufeta) i 3) 48h després de la realització de la cursa.

11.2.3. Paràmetres mesurats:

Els paràmetres bioquímics i hematològics de les mostres de sang es van analitzar en les instal·lacions de Bioquímica i Hematologia Clíniques de l'Hospital Germans Trias i Pujol mitjançant procediments estàndard. La glucosa i els lípids en sang, la urea, la proteïna total, els ions, ALT, AST, LDH i GGT es van analitzar mitjançant química clínica de rutina mitjançant tècniques enzimàtiques. El recompte sanguini complet es va realitzar amb l'analitzador hematològic automatitzat Unicel DxH800 (Beckman Coulter, Miami, FL, EUA). La determinació de la creatina quinasa sèrica (CK) i de la proteïna C reactiva (CRP) es va fer mitjançant l'analitzador de química AU-5800 (Beckman Coulter). La troponina T es va mesurar a partir del sèrum, utilitzant un assaig de Troponina-T d'alta sensibilitat en una plataforma Cobas e601 (Roche Diagnostics, Barcelona, Espanya).

Els nivells de GDF15 i d'FGF21 es van mesurar com s'ha explicat anteriorment en aquests materials i mètodes.

12. Anàlisi estadística

Les dades es presenten com a mitjanes \pm s.e.m. Es va aplicar la prova de Kolmogorov-Smirnov per comprovar la distribució normal. Les diferències entre els diferents subgrups es van analitzar utilitzant un test *t-student* de dades no aparellades o un test *Mann-Whitney U* per variables amb distribució normal o no-paramètriques, respectivament. En els casos on hi havia més de dues condicions experimentals es va utilitzar el test ANOVA d'un factor, seguit dels post-test *Dunnet* o *Turkey*. Per comparar dos factors diferents es va utilitzar l'ANOVA de dos factors. Tota l'anàlisi estadística es va dur a terme amb el programa estadístic GraphPad (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA). Es va considerar significació estadística quan $p < 0,05$.

RESULTATS

Part 1. Estudis experimentals en models animals i cel·lulars: Paper de GDF15 com a batoquina.

L'activació termogènica indueix l'expressió de GDF15 al teixit adipós marró.

Per tal d'identificar nous candidats a adipoquina marró (o batoquina), es va emprar una doble aproximació de mineria de dades transcriptòmiques (*transcriptomic data-mining*). Es va dur a terme una seqüenciació massiva d'RNA (*RNA Sequencing*) de TAM interesapular de ratolins mantinguts a 30°C, temperatura de neutralitat en els ratolins, i de ratolins exposats a 4°C durant 24h (Cereijo et al., 2018). Els transcrits sobreexpressats en fred i que codificaven per proteïna van ser, posteriorment, seleccionats pel seu potencial de secreció al medi extracel·lular, utilitzant les aplicacions *TargetP 1.1* i *SecretomeP*, juntament amb les dades de la base de dades *Gene Ontology data base*. Amb aquesta anàlisi s'identificaren proteïnes secretades pel TAM durant el procés de la termogènesi adaptativa àmpliament conegudes com FGF21, BMP8B o la neuregulina 4 (NRG4), validant, així, l'estratègia (Villarroya et al., 2016), però també altres potencials nous factors secretats pel TAM en resposta a l'activació termogènica; un d'aquests fou la proteïna GDF15.

Els primers experiments realitzats en aquesta tesi, doncs, es centraren en confirmar la resposta de l'expressió gènica de GDF15 a l'estímul de fred. L'exposició de ratolins a 4°C durant 1 dia va representar un increment considerable dels nivells d'expressió de GDF15 en el teixit adipós marró, arribant a nivells similars als del fetge, el teixit amb més expressió gènica de GDF15 en condicions normals (Figura 31.A). L'exposició de ratolins a 4°C durant 21 dies va resultar en un augment significatiu dels nivells d'expressió de GDF15 en el TAM, així com, un augment en el TAB inguinal (TABi), indicant, així, un augment dels nivells de GDF15 amb el *browning* del TABi (TAB subcutani). Els nivells d'expressió de GDF15 hepàtics tendien a disminuir en ratolins exposats a condicions de fred durant 1 o 21 dies, mentre que els nivells d'expressió de GDF15 en el TAB epididimal (TABe) i en el múscul esquelètic no es van veure alterats (Figura 31.A).

L'augment en els nivells d'expressió de GDF15 en el TAM i en el TABi es va traduir en un augment dels nivells de proteïna GDF15 en el teixit després de 21 dies d'exposició al fred (Figura 31.B). No obstant això, els nivells de proteïna GDF15 circulant no es trobaren alterats per l'exposició al fred (Figura 31.C). Els ratolins control es van mantenir aproximadament a 22°C (temperatura de l'estabulari).

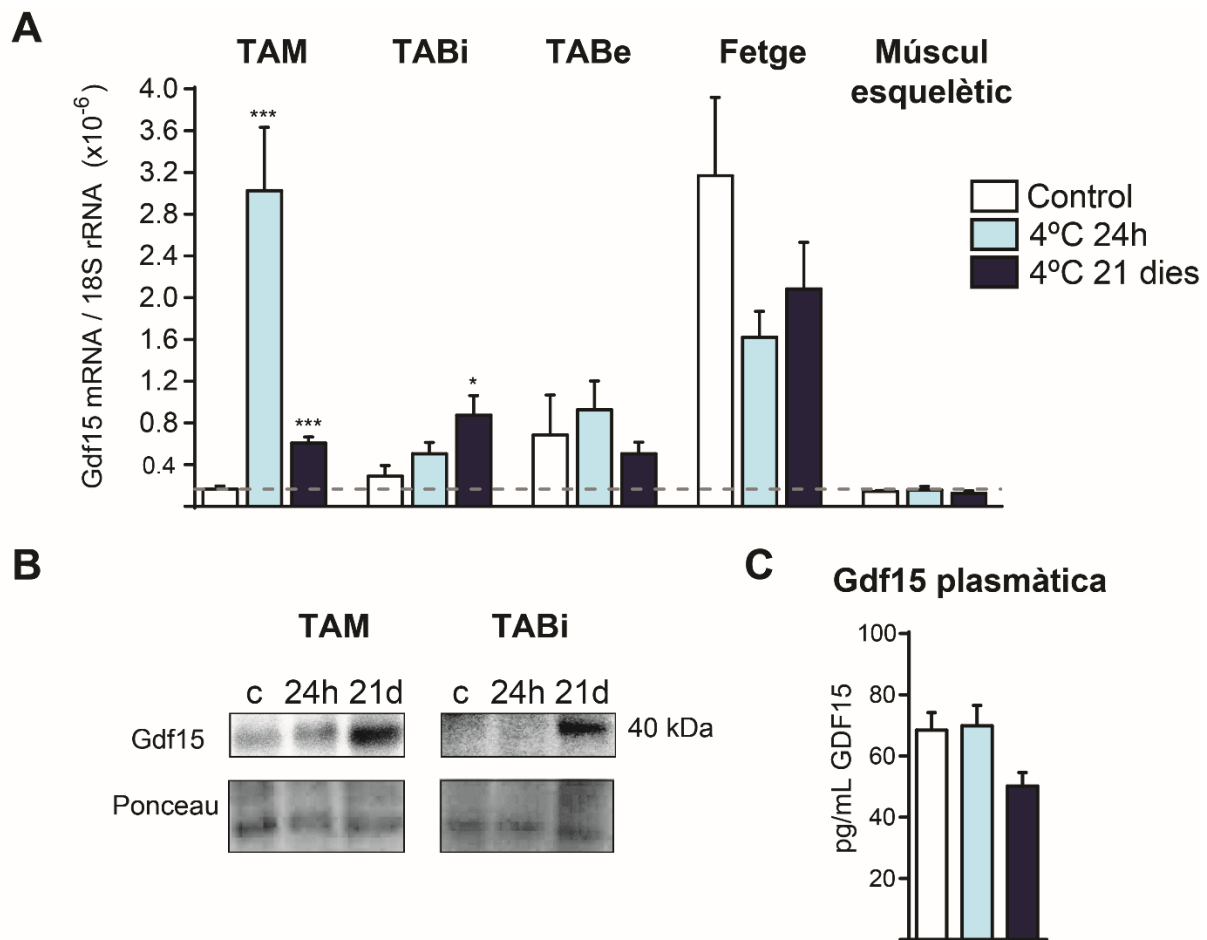


Figura 31. GDF15 és induït en el teixit adipós de ratolí després d'un estímul de fred. (A) Nivells relatius de mRNA de GDF15 al TAM, TABi, TABe, fetge i múscul esquelètic, (B) immunoblot de GDF15 al TAM i TABi, i (C) nivells plasmàtics de GDF15 en ratolins exposats 24 h o 21 dies a 4°C en comparació amb ratolins mantinguts a 22°C (control). (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$) pel que fa al control. Les barres representen mitjanes \pm s.e.m

L'activació adrenèrgica β_3 és el principal mecanisme implicat en l'activació termogènica del TAM pel fred i en la inducció del *browning* del TABi (Nedergaard and Cannon, 2014). Ratolins tractats diàriament durant 1 setmana amb l'agonista adrenèrgic β_3 , CL316,243, presentaven nivells d'expressió de GDF15 significativament més elevats en el TAM i en el TABi, però no en el TABe ni en el fetge, en comparació amb ratolins control, injectats diàriament amb salí (Figura 32.A). Els nivells de proteïna GDF15 dins del teixit també es trobaren incrementats en el TAM i en el TABi després del tractament amb el CL316,243 (Figura 32.B). Finalment, els nivells de proteïna GDF15 circulants no es van trobar modificats en resposta a aquest tractament (Figura 32.C). Així, es confirmava la implicació de la via adrenèrgica β_3 en la resposta de GDF15 a l'estímul de fred en el TAM i en el TABi.

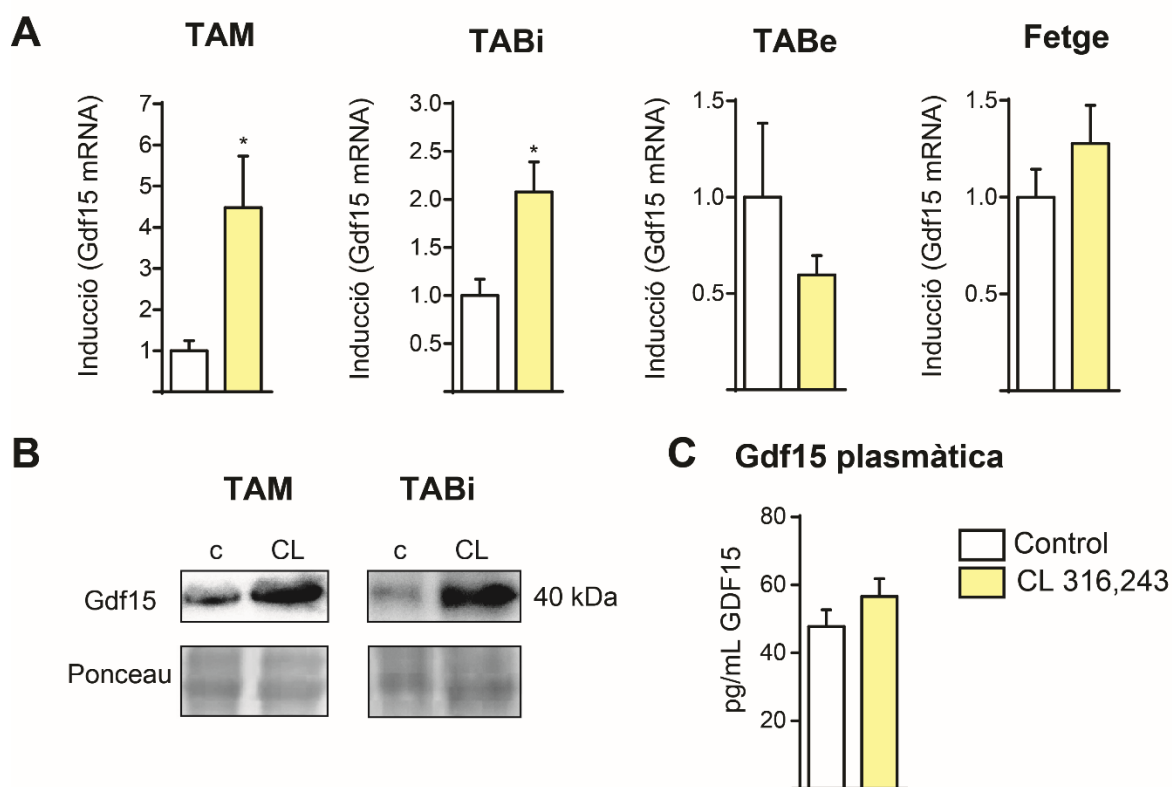


Figura 32. La via adrenèrgica $\beta 3$ indueix GDF15 en el TAM i el TABi. (A) Nivells d'mRNA de GDF15, (B) immunoblot de GDF15 al TAM i TABi i (C) nivells circulants de GDF15 en ratlins injectats diàriament durant 8 dies amb l'agonista del receptor $\beta 3$ -adrenèrgic, CL316,243, o salí (control). (* $p < 0,05$) pel que fa al control. Les barres representen mitjanes \pm s.e.m.

L'activació noradrenèrgica, mitjançada per AMPc, de la termogènesi indueix tant l'expressió com la secreció de GDF15 per part dels adipòcits marrons.

El teixit adipós marró, per tant, respon a l'estímul adrenèrgic augmentant els nivells de GDF15 dins d'aquest teixit. Ara bé, dins del TAM hi trobem diversos tipus cel·lulars, essent els adipòcits marrons els principals. Per tal de determinar si la resposta de GDF15 a l'estímul adrenèrgic tenia lloc en els adipòcits marrons, es tractaren adipòcits marrons immortalitzats amb el principal mediador fisiològic, a nivell dels adipòcits, de l'activació de la termogènesi pel fred, la noradrenalina. La noradrenalina és alliberada per les neurones que innerven el TAM en resposta a l'estímul de fred, on interacciona amb el receptor adrenèrgic $\beta 3$. En la figura 33.A podem veure l'augment d'expressió de GDF15 en resposta al tractament amb la NA a diferents temps. Addicionalment, l'anàleg permeable del segon missatge AMPc, el dibutiril-AMPc, que simula el mecanisme intracel·lular de l'activació adrenèrgica $\beta 3$, també provocava l'augment dels nivells d'expressió de GDF15 en adipòcits marrons (Figura 33.A). Aquests efectes es produïen en paral·lel a la inducció dels nivells d'mRNA d'UCP1, principal proteïna del procés de la

termogènesi i, per tant, principal marcador de l'activitat termogènica dels adipòcits marrons. Tanmateix, el tractament amb un agonista de PPAR α , GW7647, no modificava els nivells d'expressió de GDF15, tot i augmentar els nivells d'expressió d'UCP1 (Figura 33.A). PPAR α és un conegut activador de la termogènesi independent de la via noradrenèrgica. Aquests resultats confirmaren la regulació dels nivells d'mRNA de GDF15 en els adipòcits marrons a través de la via clàssica d'activació del TAM; la via adrenèrgica β 3, mitjançada per l'AMPc. Els nivells de GDF15 secretats al medi de cultiu cel·lular també es trobaren incrementats després del tractament amb NA i AMPc, indicant, així, que els adipòcits marrons no només expressen GDF15 sinó que també secreten aquesta proteïna al medi extracel·lular (Figura 33.B). Es va analitzar la regulació de l'expressió de GDF15 en un model de *browning*, en aquest cas es tractava d'un model humà, la línia cel·lular d'adipòcits blancs induïbles SGBS (Yeo et al., 2017). Els nivells d'mRNA de GDF15 i d'UCP1 augmentaven amb el tractament amb dibutiril-AMPc en els adipòcits SGBS (Figura 34.C).

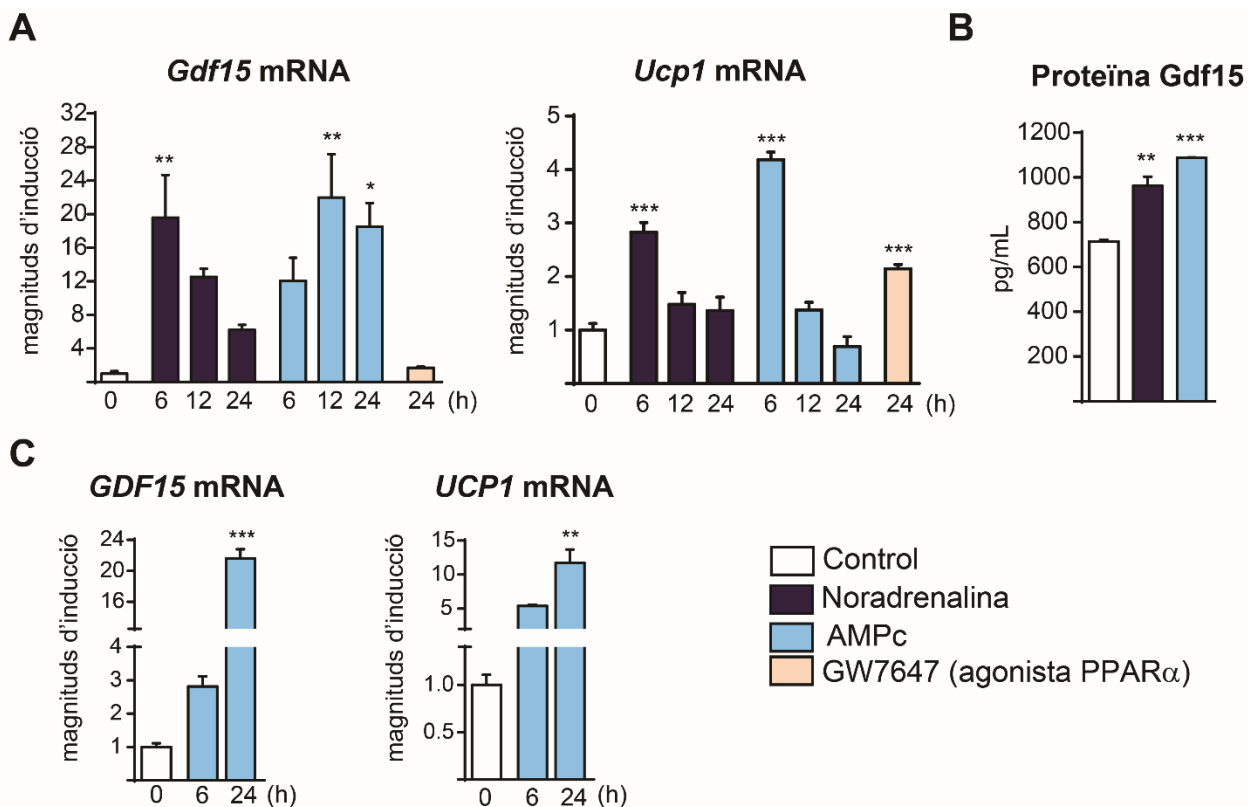


Figura 33. Inducció de GDF15 en adipòcits marrons activats termogènica. (A) Nivells d'expressió de GDF15 i d'UCP1 d'adipòcits marrons de ratolí immortalitzats tractats amb NE 0,5 μ M i amb AMPc 1mM durant 6, 12 i 24 h i amb GW7647 (agonista PPAR α) durant 24 h. (B) Nivells de proteïna GDF15 secretada al medi d'adipòcits marrons tractats amb NE 0,5 μ M i amb AMPc 1 mM durant 24 h. (C) Nivells d'expressió de GDF15 i d'UCP1 en adipòcits SGBS humans tractats amb AMPc 1 mM durant 6 i 24 h. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$) pel que fa als controls. Les barres representen mitjanes \pm s.e.m.

A continuació, es va investigar la via intracel·lular de regulació de GDF15 en adipòcits marrons de ratolí. Els adipòcits marrons tractats amb el compost H89 (inhibidor de la PKA) perdien la capacitat d'induir l'expressió de GDF15 en resposta a l'AMPc. En canvi, els adipòcits marrons tractats amb el compost SB202190 (inhibidor de la p38 MAPK) o amb el compost GW6471 (antagonista de PPAR α) no mostraren la capacitat d'induir l'expressió de GDF15 en resposta a l'AMPc alterada, contrastant amb els resultats obtinguts en els nivells d'expressió d'UCP1. En el cas d'UCP1 la inducció per AMPc es va veure reduïda en tots aquests tractaments (Figura 34.A), tal i com era d'esperar (Cao et al., 2001; Fisher et al., 2012). Aquests resultats indicaven que, a diferència de la regulació d'UCP1, la PKA juga un paper en la regulació de l'expressió de GDF15, mentre que la p38 MAPK no sembla estar-hi involucrada.

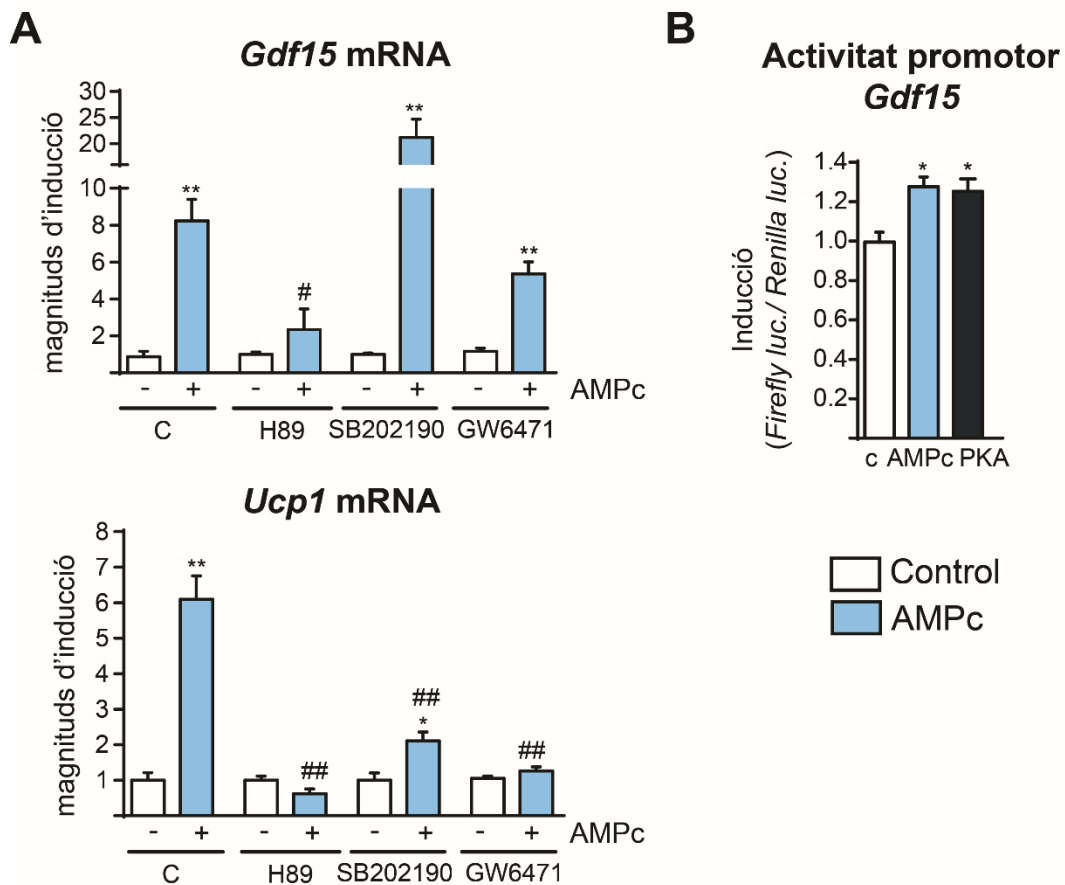


Figura 34. Regulació de GDF15 en adipòcits marrons activats termogènica. (A) Nivells d'expressió de GDF15 i d'UCP1 en adipòcits marrons de ratolí tractats amb AMPc i amb els inhibidors H89 20 μ M (inhibidor PKA), SB202190 10 μ M (inhibidor p38-MAPK) i GW6471 10 μ M (antagonista PPAR α) durant 6 h. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$) entre els tractats o no amb AMPc en cadascun dels grups de tractament (C, H89, SB202190 i GW6471) i (# $p < 0,05$, ## $p < 0,01$) en relació amb el control tractat amb AMPc. (B) Mesura de l'activitat del promotor de GDF15 en adipòcits marrons no diferenciats (línia cel·lular HIB-1B) tractats amb AMPc o co-transfectats amb una forma constitutivament activa de la PKA. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$) pel que fa al control. Les barres representen mitjanes \pm s.e.m.

El tractament amb AMPc d'adipòcits marró HIB-1B prèviament transfectats amb un vector que contenia el gen de la luciferasa dirigit per la regió promotora del gen GDF15 induïa significativament l'activitat del promotor d'aquest. La co-transfecció amb un vector que contenia una forma constitutivament activa de la PKA també donava lloc a una activació significativa d'aquest mateix promotor (Figura 34.B), confirmant la implicació de la PKA en la regulació noradrenèrgica, mitjançada per AMPc, de la transcripció del gen de GDF15.

L'activació termogènica dels adipòcits marrons provoca l'augment tant dels nivells de la proteïna GDF15 precursora com els nivells de la proteïna GDF15 madura, forma processada.

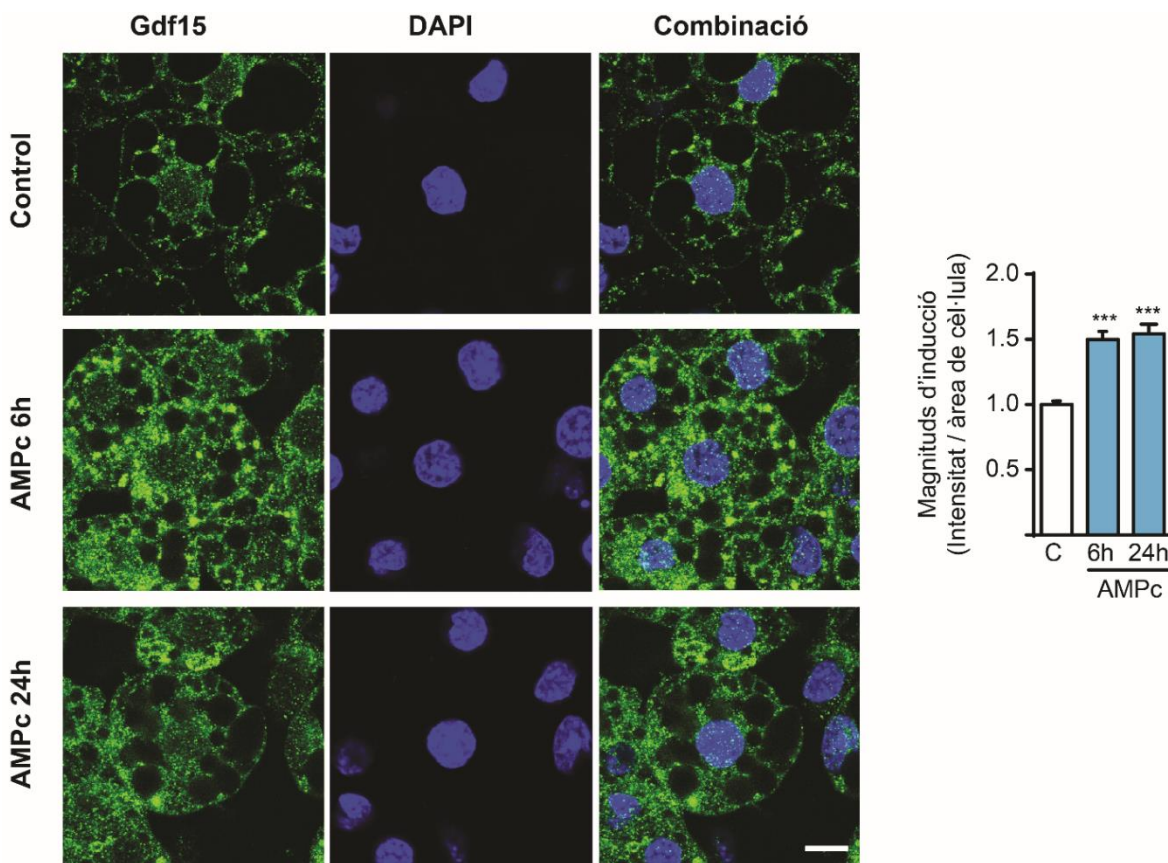


Figura 35. Augment dels nivells intracel·lulars de GDF15 en adipòcits marrons després de l'activació termogènica. Esquerra: detecció de GDF15 endogen per immunofluorescència (verd) en adipòcits marrons tractats amb AMPc 1 mM durant 6 i 24 h. Els nuclis van ser tenyits amb DAPI (blau) (escala: 10 µm). Dreta: intensitat de fluorescència per àrea de cèl·lula. Imatges obtingudes amb microscòpia confocal. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$) relatiu als controls. Les barres representen mitjanes \pm s.e.m.

La proteïna GDF15 és sintetitzada en forma de precursor que posteriorment és tallat per tal de ser alliberada al medi extracel·lular en la seva forma madura de 25 kDa. Els adipòcits

marrons immortalitzats varen augmentar considerablement els nivells intracel·lulars de la proteïna GDF15, com es mostra en les immunofluorescències de la figura 35. Tal i com Min et al. havien publicat al 2015, GDF15 no només presentava una localització citoplasmàtica sinó també nuclear (Min et al., 2015).

L'anàlisi per western blot revelà l'augment dels nivells intracel·lulars de la proteïna GDF15 madura, així com la disminució, a la vegada, dels nivells intracel·lulars de la forma precursora d'aquesta en adipòcits marrons tractats amb AMPc (Figura 36). L'anàlisi del medi de cultiu d'aquests adipòcits marrons mostrà un augment considerable dels nivells de la forma madura de GDF15 amb el tractament amb AMPc. Els nivells de la forma precursora de GDF15 no varen ser detectats en el medi de cultiu (Figura 36). Aquests resultats indiquen que la regulació β adrenèrgica, mitjançada per AMPc, de la secreció de la proteïna GDF15 al medi extracel·lular per part dels adipòcits marrons involucra tant processos transcripcionals, que indueixen la síntesi de proteïna GDF15, com processos post-transcripcionals, que promouen el processament de la forma de GDF15 precursora per donar lloc a la forma madura.

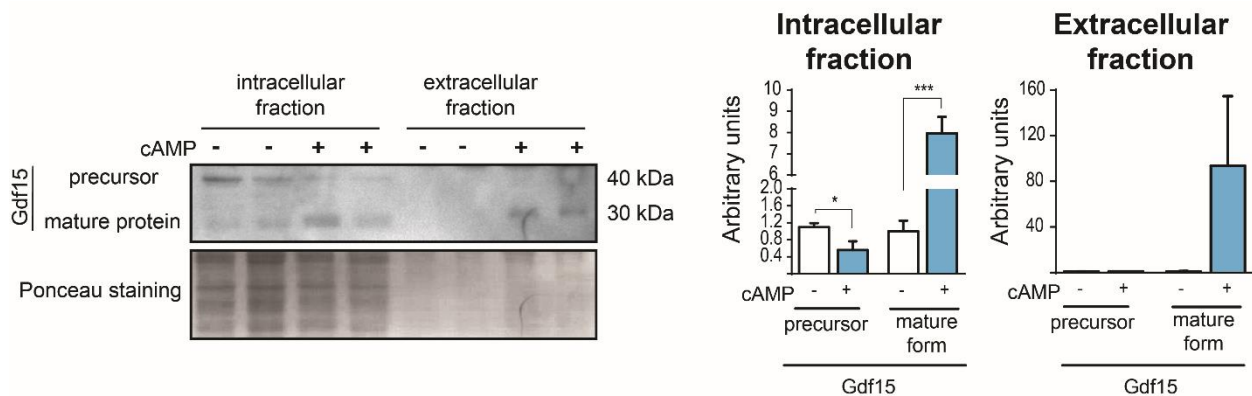


Figura 36. Augment dels nivells intracel·lulars de GDF15 en adipòcits marrons després de l'activació termogènica. Esquerra: Immunoblot de GDF15 a partir d'extractes de proteïnes cel·lulars i de medis d'adipòcits marrons tractats amb AMPc durant 24 h. Dreta: quantitats relatives mesurades per densitometria utilitzant el *ponceau* com a control de càrrega. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$) relatiu als controls. Les barres representen mitjanes \pm s.e.m.

Els efectes autocrins d'FGF21 estan implicats en la inducció de l'expressió de GDF15 en resposta a l'activació termogènica.

FGF21 és un factor secretable i induït per mecanismes noradrenèrgics, mitjançats per AMPc, en adipòcits marrons. FGF21 a part d'actuar com a factor endocrí, porta a terme accions autocrines en els adipòcits marrons i beix, afavorint l'activitat termogènica d'aquests (Fisher et al., 2012; Quesada-López et al., 2016). El tractament d'adipòcits

marrons amb la proteïna FGF21 recombinant va augmentar els nivells d'expressió GDF15, així com la secreció d'aquesta al medi de cultiu (Figura 37).

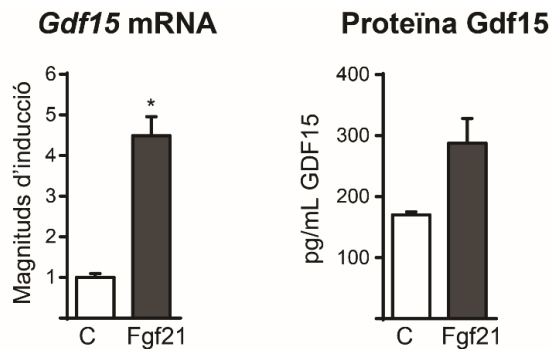


Figura 37. El sistema FGF21 està involucrat en l'activació de GDF15. Nivells d'mRNA i de proteïna de GDF15 en adipòcits marrons immortalitzats tractats amb FGF21 recombinant 100 nM durant 24 h. (* $p < 0,05$). Les barres representen mitjanes \pm s.e.m

El cultiu primari d'adipòcits marrons procedents de ratolins deficientes pel gen FGF21 no mostrà diferències morfològiques (Figura 39) ni alteracions en els gens relacionats amb el procés d'adipogènesi en condicions basals (Taula 9). Tanmateix, el tractament d'adipòcits marrons deficientes per FGF21 amb l'agonista adrenèrgic $\beta 3$ CL316,243 no induïa l'expressió de GDF15 (ni l'expressió d'UCP1, tal com s'esperava), a diferència de l'observat en ratolins control on, l'expressió de GDF15 (i d'UCP1) era fortament induïda amb el tractament amb CL316,243 (Figura 38.A). D'aquesta manera, la secreció d'FGF21 semblava ser necessària per a la inducció de l'expressió de GDF15 i la seva alliberació en adipòcits marrons en resposta a l'activació adrenèrgica.

Paral·lelament, es van tractar adipòcits beix procedents de ratolins control i de ratolins deficientes pel gen FGF21. Aquests adipòcits beix mostraven uns resultats similars als obtinguts amb els adipòcits marrons, ampliant així l'exigència de l'acció autocrina d'FGF21 en la regulació de l'expressió de GDF15 als adipòcits beix (Figura 38.A).

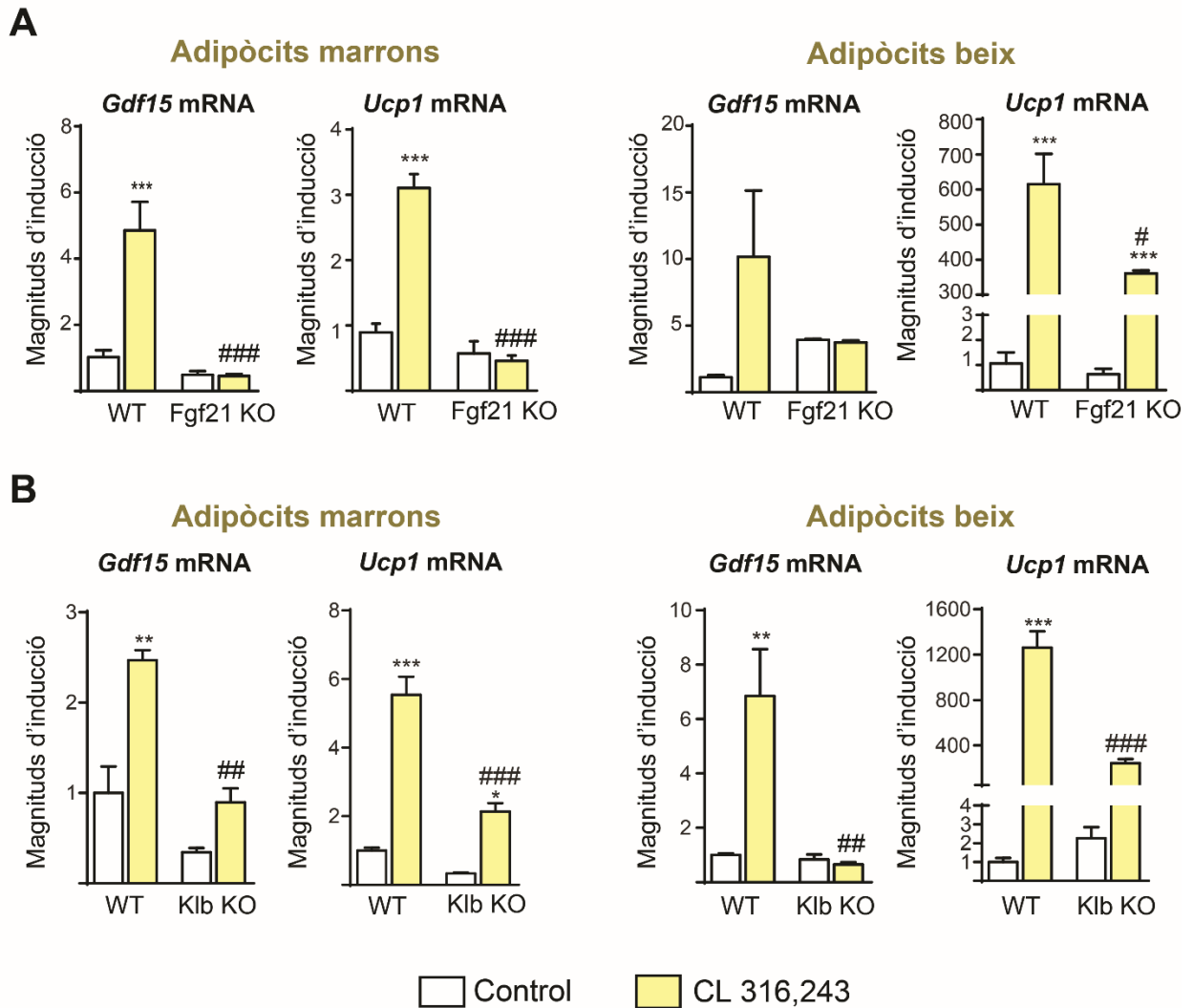


Figura 38. El sistema FGF21 està involucrat en l'activació de GDF15. (A) Nivells d'expressió de GDF15 i UCP1 en adipòcits marró i beix de ratolins WT i FGF21-KO diferenciats i tractats amb CL316,243 1 μ M durant 24 hores i (B) nivells d'expressió de GDF15 i UCP1 en adipòcits marró i beix de ratolins WT i KLB-KO diferenciats i tractats amb 1 μ M CL316,243 durant 24 h. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$) relatiu als controls i (# $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$) entre genotips. Les barres representen mitjanes \pm s.e.m.

Per tal de corroborar els resultats obtinguts amb els ratolins deficients per FGF21, es van analitzar adipòcits marrons i beix procedents de ratolins control i de ratolins deficients per la proteïna β klotho (KLB). La proteïna KLB és un coactivador essencial per la senyalització cel·lular d'FGF21 (Kharitonov et al., 2008). Els adipòcits marrons deficients per KLB es van diferenciar d'igual manera que els adipòcits marrons provinents de ratolins control, segons la morfologia dels adipòcits (Figura 39) i els marcadors gènics d'adipogènesi (Taula 10), que no es veien alterats. Tanmateix, els adipòcits marrons diferenciats deficients per KLB mostraren una capacitat fortament alterada per augmentar l'expressió gènica de GDF15 en resposta al tractament amb el CL316,243 en comparació

amb els adipòcits marrons control (Figura 38.B). Es van observar resultats similars utilitzant adipòcits beix (Figura 38.B). Notablement, no es van detectar alteracions en l'expressió del receptor $\beta 3$ a les cèl·lules deficientes per FGF21 ni a les cel·les deficientes per KLB (Taules 9 i 10). Aquests resultats confirmen que l'acció autocrina d'FGF21 està implicada en la resposta de GDF15 a l'activació adrenèrgica $\beta 3$.

Taula 9. Nivells d'expressió d'mRNA de gens relacionats amb a diferenciació adipocitària en adipòcits marrons i beix de ratolins deficientes per FGF21 en relació als nivells en adipòcits provinents de ratolins control.

	Adipòcits marrons		Adipòcits beix	
	WT	FGF21 KO	WT	FGF21 KO
<i>Adrb3</i>	1.00 ± 0.07	1.08 ± 0.39	1.00 ± 0.12	1.48 ± 0.20
<i>Glut1</i>	1.00 ± 0.09	0.82 ± 0.15	1.00 ± 0.18	0.85 ± 0.14
<i>Fabp4</i>	1.00 ± 0.10	0.96 ± 0.20	1.00 ± 0.22	0.80 ± 0.13
<i>Klb</i>	1.00 ± 0.12	1.08 ± 0.24	1.00 ± 0.12	0.85 ± 0.12

(* p <0,05,) relatiu als ratolins control. Valors normalitzats en relació als animals WT i expressats com mitjanes ± s.e.m

Taula 10. Nivells d'expressió d'mRNA de gens relacionats amb a diferenciació adipocitària en adipòcits marrons i beix de ratolins deficientes per KLB en relació als nivells en adipòcits provinents de ratolins control.

	Adipòcits marró		Adipòcits beix	
	WT	Klb KO	WT	Klb KO
<i>Adrb3</i>	1.00 ± 0.08	0.85 ± 0.05	1.00 ± 0.27	0.85 ± 0.10
<i>Glut1</i>	1.00 ± 0.06	1.16 ± 0.06	1.00 ± 0.13	0.74 ± 0.07
<i>Fabp4</i>	1.00 ± 0.03	1.03 ± 0.07	1.00 ± 0.31	0.75 ± 0.07
<i>Fgf21</i>	1.00 ± 0.35	0.22 ± 0.01	1.00 ± 0.24	0.80 ± 0.04

(* p <0,05,) relatiu als ratolins control. Valors normalitzats en relació als animals WT i expressats com mitjanes ± s.e.m

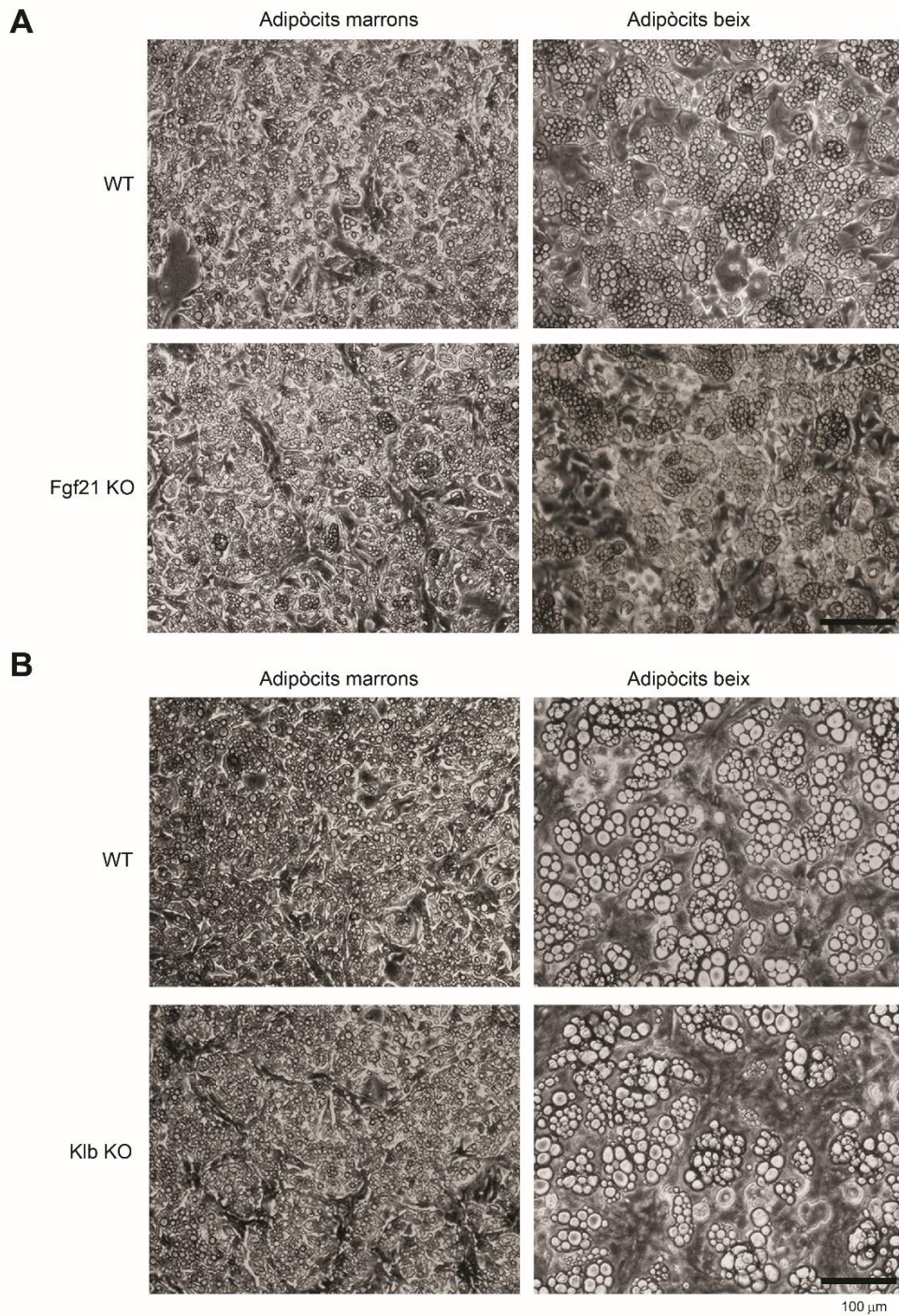


Figura 39. Morfologia dels cultius primaris d'adipòcits marrons i beix deficients per FGF21 o per KLB. Imatges de microscòpia òptica representatives d'adipòcits marrons i beix diferenciats procedents de precursors de TAMi i TABi de ratolins control i de ratolins deficients per FGF21 (A) o per KLB (B). Imatges adquirides al final del procés de diferenciació (dia 10).

La proteïna GDF15 alliberada pels adipòcits marrons actua en els macròfags.

Fins ara hem ensenyat com la proteïna GDF15 és alliberada pels adipòcits marrons i beix en resposta a un estímul termogènic. Així com que els nivells circulants de GDF15 no es veuen alterats en resposta al mateix estímul. Per explorar els possibles efectes autocrins de la proteïna GDF15 secretada pels adipòcits marrons, vam tractar adipòcits marrons amb proteïna GDF15 recombinant. No es varen observar efectes del tractament d'adipòcits marrons amb proteïna GDF15 recombinant, fins i tot a nivells farmacològics (tractament fins a 1 µg/mL), en l'expressió de marcadors termogènics (Taula 11).

Taula 11. Nivells d'expressió d'mRNA de gens relacionats amb el procés de la termogènesi adaptativa en adipòcits marrons tractats amb proteïna GDF15 recombinant.

	Proteïna GDF15 recombinant (ng/mL)				
	CTL	0.5	10	100	1000
<i>Ucp1</i> (x10⁻⁴)	2.48 ± 0.08	3.01 ± 0.02	2.23 ± 0.17	2.36 ± 0.11	2.32 ± 0.42
<i>Ppargc1a</i> (x10⁻⁴)	1.42 ± 0.14	1.50 ± 0.17	1.17 ± 0.07	1.16 ± 0.06	1.05 ± 0.25
<i>Dio2</i> (x10⁻⁷)	4.07 ± 0.81	2.92 ± 0.35	2.73 ± 0.51	3.30 ± 0.44	2.98 ± 0.48
<i>Fgf21</i> (x10⁻⁶)	1.43 ± 0.11	1.20 ± 0.17	1.05 ± 0.08	1.20 ± 0.15	1.29 ± 0.20
<i>Klb</i> (x10⁻⁵)	7.60 ± 0.89	8.46 ± 0.59	7.16 ± 0.62	6.67 ± 0.51	6.71 ± 1.05

(*p<0.05). Valors expressats com a mitjanes ± s.e.m.

Tenint en compte dades publicades que mostren possibles efectes de GDF15 en els macròfags (Bootcov et al., 1997; Jung et al., 2018) i la creixent consciència sobre el paper dels macròfags infiltrats en el teixit adipós marró en el control de l'activitat termogènica del teixit (Villarroya et al., 2018), vàrem explorar les possibles accions paracrines de GDF15 en els macròfags. Vam trobar que el tractament amb la proteïna GDF15 recombinat reprimia significativament l'expressió gènica de gens pro-inflamatoris com el factor de necrosi tumoral-α (TNFα), la proteïna quimiotàctica per a monòcits 1 (MCP1) i l'interleucina-6 (IL6) en macròfags RAW 264.7 prèviament induïts a un fenotip pro-inflamatori, tipus M1, amb el tractament amb LPS. Els macròfags prèviament induïts per adquirir un fenotip M2, a través del tractament amb IL4, no van mostrar alteracions en l'expressió dels marcadors M2, MRC1, ARG1 i CLEC10A després del tractament amb la proteïna GDF15 recombinant (Figura 40.A). El tractament amb GDF15 també va reduir la secreció per part dels macròfags de les citocines pro-inflamatòries TNFα i MCP1 (Figura 40.B).

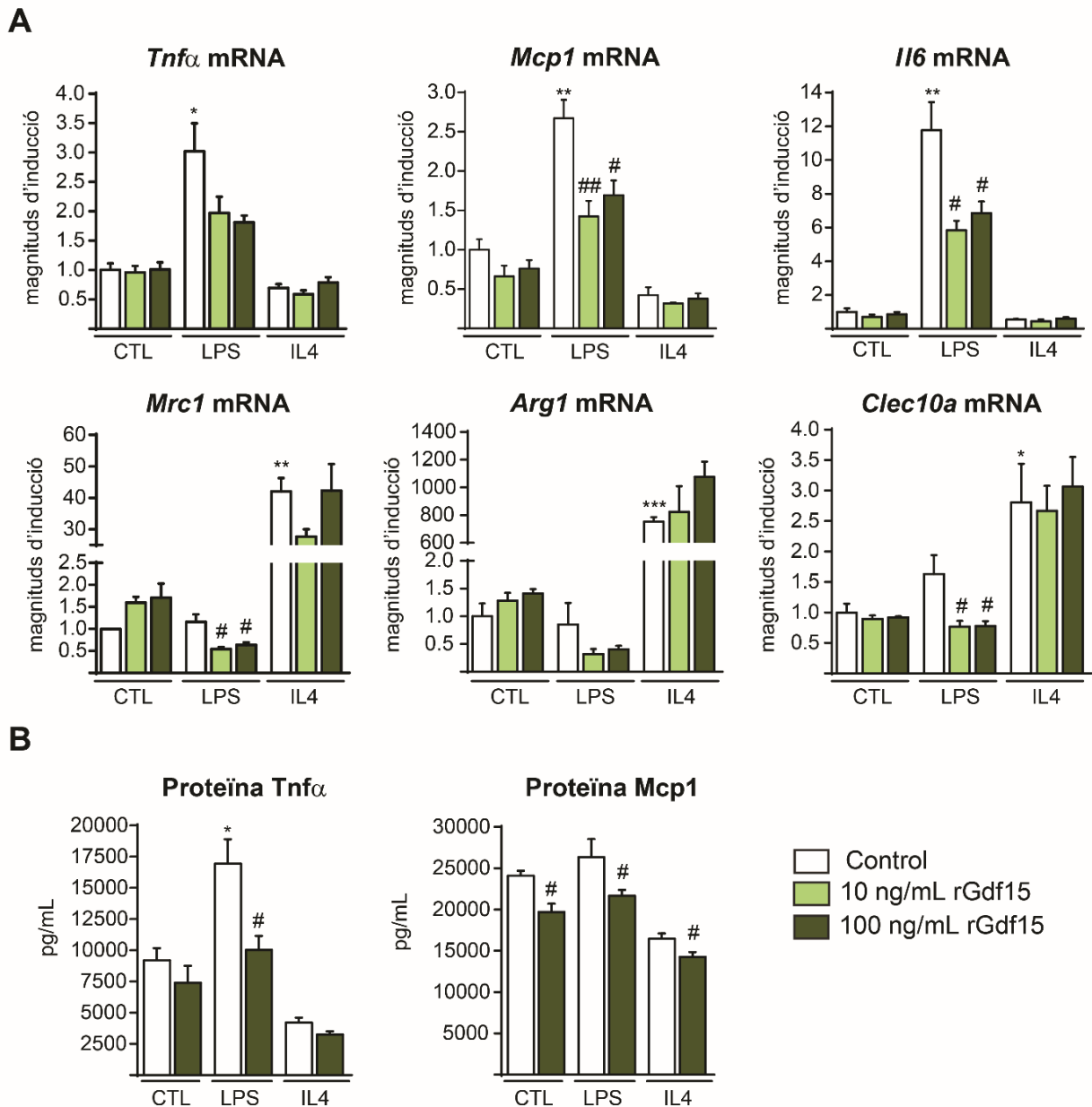


Figura 40. GDF15 reprimeix els marcadors inflamatoris en els macròfags RAW 264.7. (A) Nivells d'mRNA dels marcadors de macròfags M1 (*Tnfα*, *Mcp1* i *Il6*) i dels marcadors M2 (*Mrc1*, *Arg1* i *Clec10a*) i (B) nivells de proteïna *Tnfα* i *Mcp1* secretada al medi en cèl·lules RAW 264.7 pre-tractades amb 60 ng/mL de LPS (activació a fenotip M1) o amb 40 ng/mL d'interleucina 4 (IL4) (activació a fenotip M2) durant 12 h i amb 0, 10 o 100 ng/mL de proteïna GDF15 recombinant durant 12 h més. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$) relatiu als controls i (# $p < 0,05$, ## $p < 0,01$) en relació amb els controls tractats amb LPS. Les barres representen mitjanes \pm s.e.m.

Finalment, es van tractar macròfags de tipus M1 amb medi condicionat d'adipòcits marrons i es va trobar que els nivells d'mRNA de *TNFα* i *MCP1* estaven significativament disminuïts. La incorporació d'un anticòs contra GDF15 al medi condicionat va reduir significativament la seva capacitat d'alterar l'expressió dels gens *TNFα* i *MCP1*, mentre

que amb l'addició d'un anticòs control no va ser així. (Figura 41). Aquests resultats indicaven que la proteïna GDF15 alliberada pels adipòcits marrons està involucrada en la mediació de la senyalització anti-inflamatòria per part dels macròfags dins del teixit adipós marró.

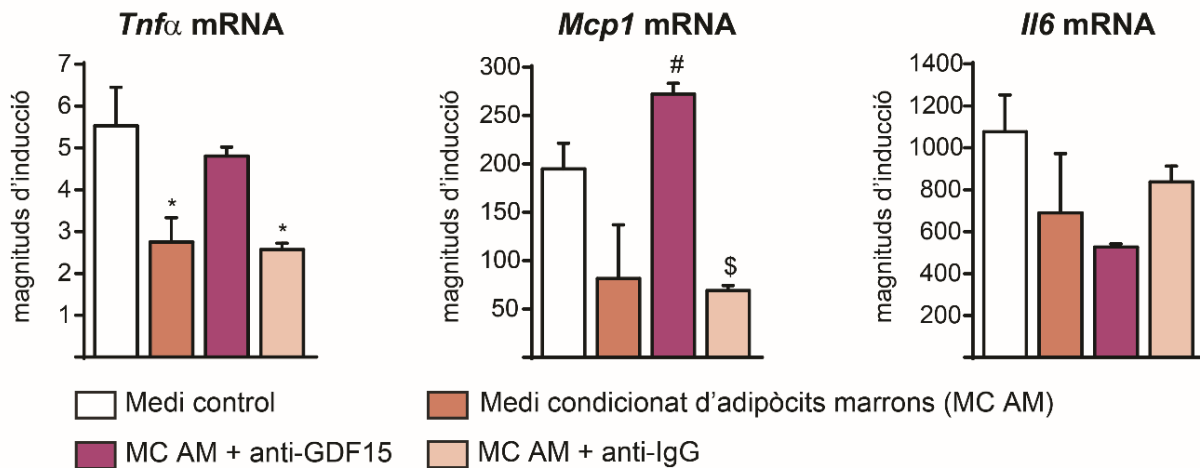


Figura 41. Efectes anti-inflamatoris de la proteïna GDF15 secretada pels adipòcits marrons.

Nivells d'mRNA de marcadors M1 de RAW264.7 activades amb LPS i tractades amb medis condicionats d'adipòcits marrons amb o sense presència d'anticòs contra GDF15 o inespecífic. (* $p < 0,05$) relatiu al medi de control, (# $p < 0,05$) relatiu al medi condicionat d'adipòcits marrons (MC AM) i (\$ $p < 0,05$) relatiu al MC AM + anticòs (contra GDF15 o inespecífic). Les barres representen mitjanes \pm s.e.m.

Vàrem decidir validar aquest últim resultat utilitzant una estratègia diferent. En aquest cas, vam tractar macròfags RAW 264,7 amb medis provinents d'adipòcits marrons *Knock-down* per GDF15. Primerament, es va validar la línia *Knock-down* establerta, mitjançant un immunoblot, per tal de corroborar la disminució de la proteïna GDF15 en aquests adipòcits. Vam trobar una disminució aproximadament del 50% en els nivells de proteïna GDF15 intracel·lulars (Figura 42.A). A l'analitzar els nivells de proteïna GDF15 en el medi de cultiu d'aquests adipòcits, vàrem comprovar que la disminució dels nivells intracel·lulars de proteïna GDF15 es traduïa en la mateixa disminució dels nivells de proteïna GDF15 secretada al medi de cultiu (Figura 42.B). L'addició d'un medi d'adipòcits marrons control (amb expressió normal de GDF15) va provocar una reducció en la resposta dels marcadors inflamatoris al tractament amb LPS (activació a fenotip inflamatori). Per altra banda, l'addició del medi d'adipòcits marrons *Knock-down* per GDF15 va revertir en certa manera aquesta reducció en el cas dels marcadors inflamatoris MCP1 i IL6 (Figura 42.C). Indicant, altra vegada, un efecte anti-inflamatori sobre els macròfags de la proteïna GDF15 alliberada pels adipòcits marrons.

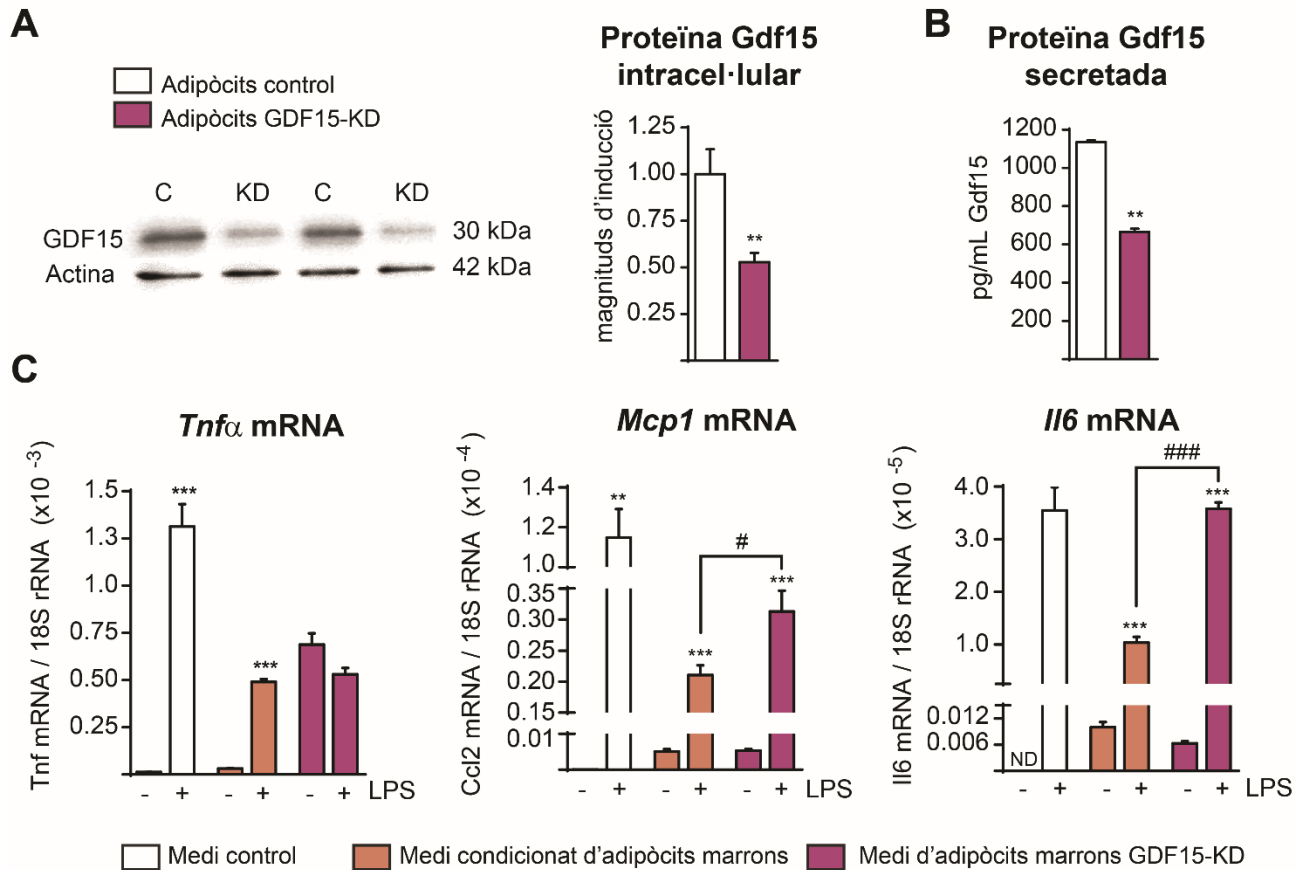


Figura 42. La reducció en els nivells de GDF15 en el medi reverteix els efectes anti-inflamatoris dels adipòcits en els macròfags. (A) Immunoblot de GDF15 en extractes cel·lulars i (B) nivells de proteïna GDF15 secretada al medi d'adipòcits marrons infectats amb partícules lentiviriques que porten un shRNA inespecífic (control) o un shRNA dirigit contra GDF15 (adipòcits GDF15-KD). Immunoblot d'actina utilitzat com a control de càrrega, en el primer cas. (C) Nivells d'mRNA de marcadors M1, TNF α , MCP1 i IL6, en macròfags RAW 264.7 activats amb LPS i tractats amb medi control de macròfags, medi condicionat d'adipòcits marrons controls o medi condicionat d'adipòcits marrons GDF15-KD. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$) relatiu al medi de control, (# $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$) relatiu al medi condicionat d'adipòcits marrons control. Les barres representen mitjanes \pm s.e.m.

Part 2. Estudis en humans

Estudi de GDF15 com a biomarcador de patologia mitocondrial en població pediàtrica

L'any 2014, el laboratori de la Dra. Cecília Jimenez-Mallebrera publicà un estudi descrivint GDF15 com a possible marcador de patologia mitocondrial en nens. Aquests resultats s'obtingueren d'un microarray d'expressió de biòpsies de múscul esquelètic (Kalko et al., 2014). A partir d'aquest estudi, s'inicià una col·laboració amb aquest laboratori per tal d'estudiar GDF15 com a biomarcador de patologia mitocondrial en nens. Els resultats obtinguts en aquesta col·laboració van ser publicats a la revista *PLoS One* l'any 2016 (durant el desenvolupament d'aquesta tesi) (Montero et al., 2016).

En aquest estudi, vam veure com la concentració mitjana dels nivells de GDF15 circulants eren gairebé idèntics en nens sans ($350,3 \pm 21$ pg/mL; mitjana \pm SEM) i en pacients control de miopatia no mitocondrial (349,1 pg/mL) mentre que els nivells circulants d'FGF21 eren més elevats en els nens amb miopatia no mitocondrial (136,1 pg/mL) en comparació amb els controls sans (77,6 pg/mL). El rang en controls sans va ser de 155-584 pg/mL per GDF15 i 21-285 pg/mL per FGF21.

Els nivells circulants de GDF15 i d'FGF2 eren de mitjana 11 vegades més elevats en pacients de miopatia mitocondrial que en controls sans (4046, 1492 pg/ml i 885, 156 pg/ml respectivament).

GDF15 i FGF21 van mostrar tenir poder discriminadori i es va poder determinar un valor de tall per cada un dels dos factors (550 pg/mL per GDF15 i 300 pg/mL per FGF21). Els dos valors, propers al valor màxim en els pacients control, en cada cas (Figura 43.)

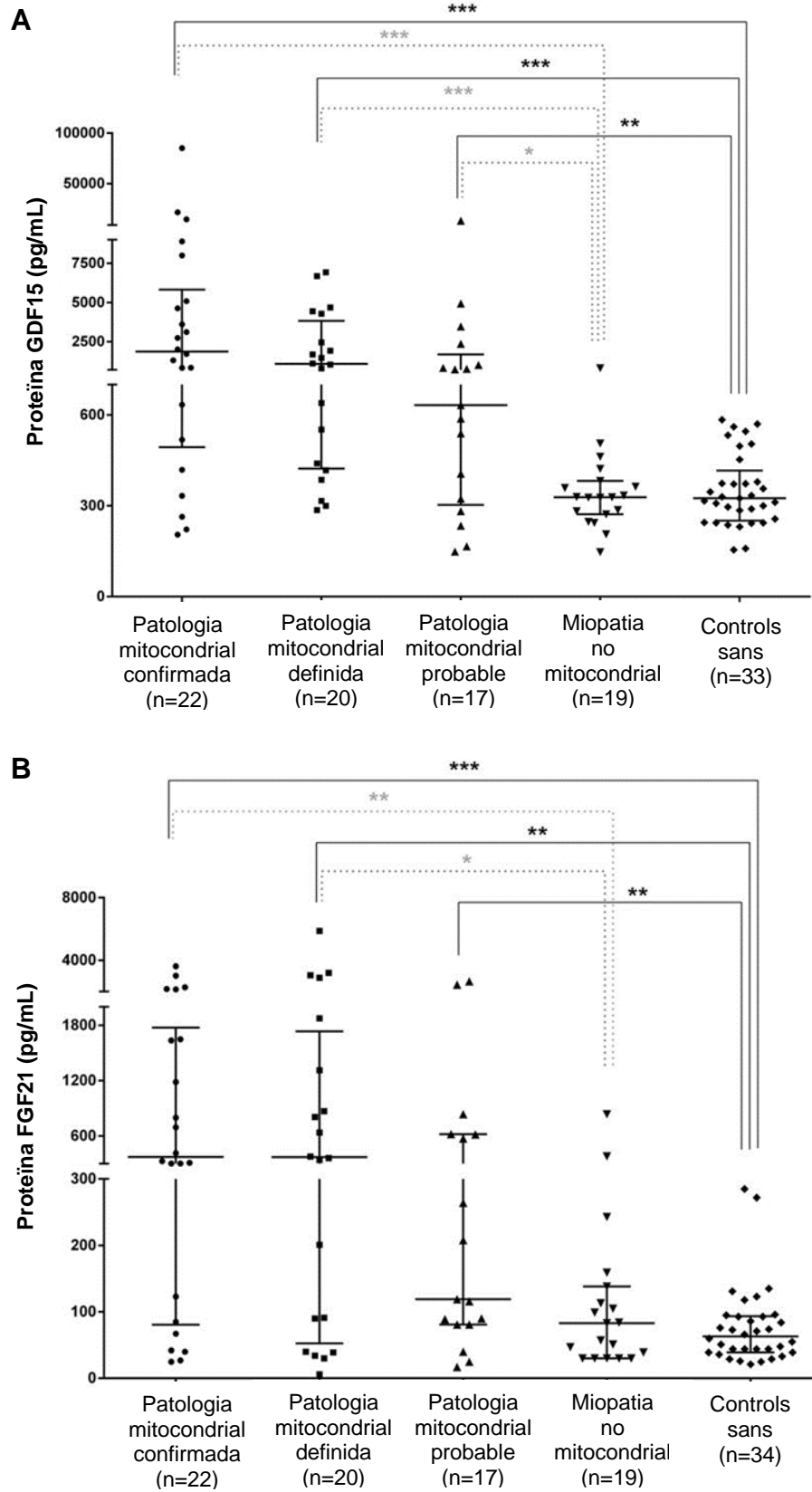


Figura 43. Nivells circulants de GDF15 i FGF21. Dades representades com a mitjanes \pm rang interquartil. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

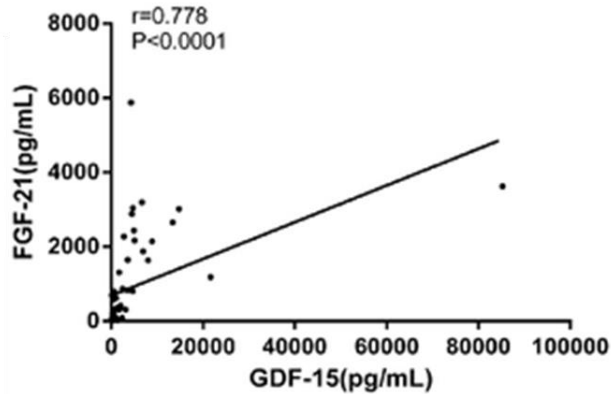


Figura 44. Anàlisi de correlació entre GDF15 i FGF21. Nivells sèrics de tots els grups de pacients anteriors (figura 43.)

En aquest estudi també es van estudiar les possibles correlacions entre aquests dos factors en aquests nens diagnosticats de miopatia mitocondrial (Figura 44). Es va trobar una forta correlació positiva entre aquests dos factors.

Finalment, totes les dades de l'estudi (veure article a l'apèndix per veure tots els resultats) indicaven que l'ús combinat dels dos factors augmenta la capacitat d'un dels factors sols d'identificar correctament els pacients. El percentatge de pacients amb GDF15 i FGF21 elevats per sobre del valor de tall va ser superior al percentatge de pacients amb GDF15 o FGF21 elevats sols. En canvi, la gran majoria dels pacients sense malaltia mitocondrial van mostrar valors dins del límit normal per als dos factors.

Considerant aquests resultats obtinguts en el laboratori de la Dra. Cecília Jimenez-Mallebrera, i com a part d'aquesta tesi, vàrem determinar si la disfunció mitocondrial afectada a l'expressió de GDF15 en les cèl·lules musculars. D'aquesta manera, es varen tractar miotubs amb dos compostos que actuen a diferents llocs de la cadena respiratòria; l'oligomicina, inhibidor de l'ATP sintasa, i l'antimicina A, inhibidor del complex III de la cadena respiratòria. En els resultats obtinguts es va anar analitzant en paral·lel GDF15 i FGF21; aquest últim ja publicat pel laboratori uns anys abans (Ribas et al., 2014).

El tractament de miotubs murins C2C12 amb oligomicina i antimicina A augmentava dràsticament l'expressió de GDF15 i d'FGF21 (Figura 45.A). En experiments paral·lels, aquests mateixos tractaments també van induir significativament els nivells d'expressió de GDF15 i d'FGF21 en miotubs humans LHCN-M2 (Figura 45.B). L'anàlisi de correlació va indicar una forta correlació positiva entre els nivells d'mRNA de GDF15 i d'FGF21, tant en les cèl·lules musculars de ratolí com en les humanes (Figura 45.C).

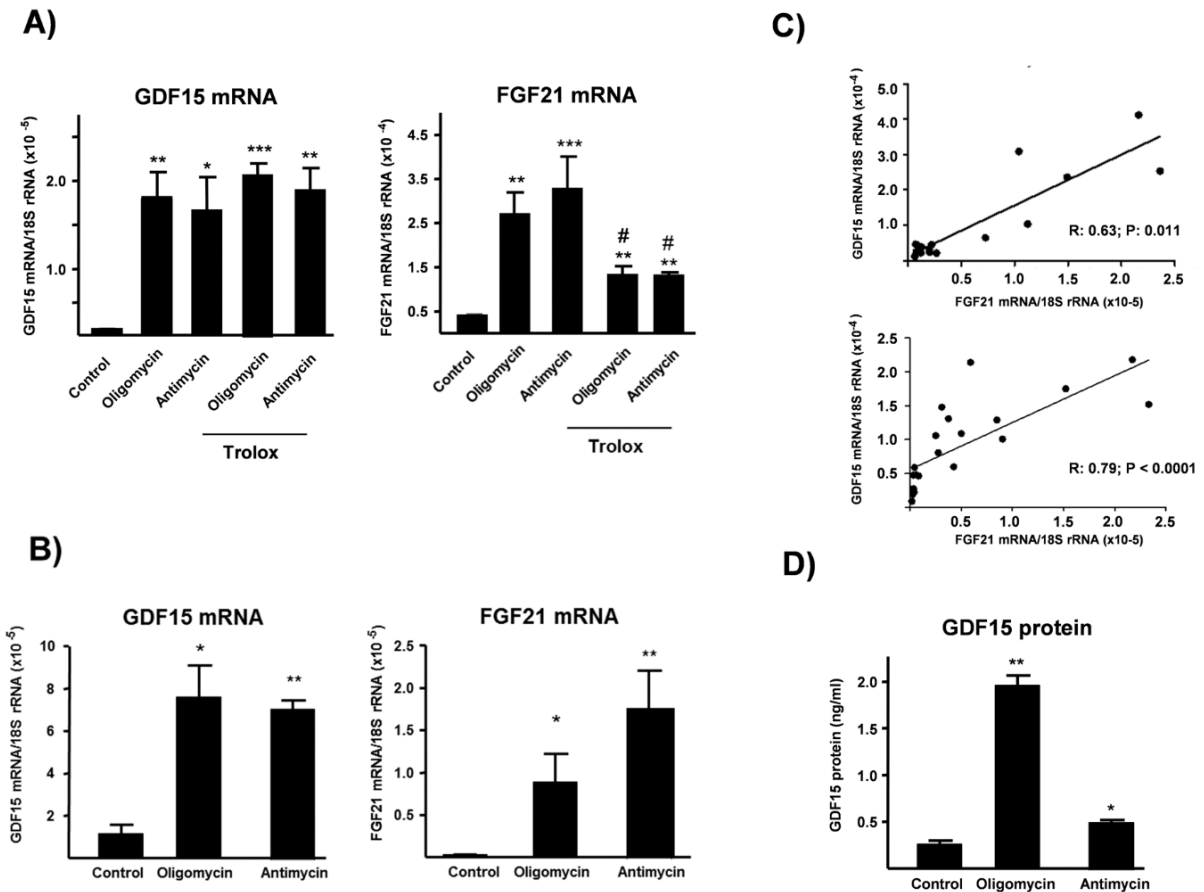


Figura 45. Efectes de la disfunció mitocondrial en cultius musculars de ratolí i humans sobre les proteïnes GDF15 i FGF21. Nivells d'mRNA de GDF15 i de FGF21 en (A) miotubs C2C12 de ratolí i (B) miotubs LHCN humans, i (C) correlació entre els nivells d'mRNA de GDF15 i els nivells d'mRNA d' FGF21 en cèl·lules C2C12 (gràfic superior) i en cèl·lules LHCN (gràfic inferior) . (D) Nivells de proteïna GDF15 secretada al medi de cultiu de miotubs C2C12. Les barres representen mitjanes \pm S.E.M. de 4-6 experiments independents. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, en relació amb els controls no tractats. # $p < 0,05$, relatiu a la condició corresponent no tractada amb Trolox.

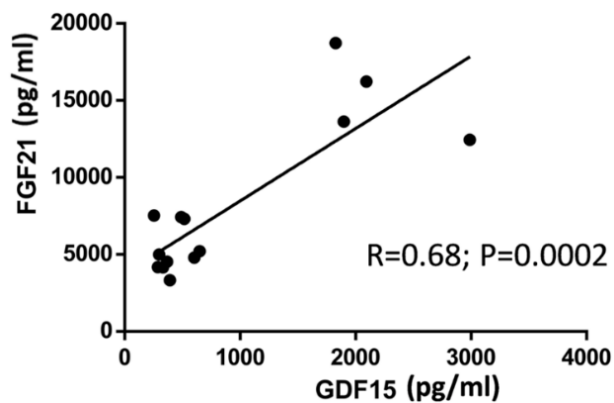


Figura 46. Anàlisi de correlació entre els nivells de proteïna GDF15 i FGF21 secretats al medi. Medis de cultiu de miotubs C2C12 tractats amb inhibidors de la cadena respiratòria.

Pel que fa als miotubs C2C12, l'augment en els nivells d'expressió de GDF15 es va traduir en un augment de la secreció de proteïna GDF15 per part d'aquests miotubs (Figura 45.D). L'anàlisi de correlació, de la mateixa manera que en el cas dels nivells d'mRNA, també va donar significativa entre els nivells de proteïna GDF15 i FGF21 secretats al medi de cultiu (Figura 46)

Coneixent la implicació de les espècies reactives de l'oxigen en la inducció dels nivells d'FGF21 en resposta a la disfunció mitocondrial (Ribas et al., 2014), vàrem voler estudiar si aquestes també es trobaven involucrades en la resposta de GDF15. Al tractar miotubs C2C12 amb oligomicina i antimicina A, i a la vegada amb el compost Trolox (conegut antioxidant i anàleg soluble de la vitamina E), vam perdre la inducció dels nivells d'FGF21, com era d'esperar, però els nivells de GDF15 no es van veure alterats (Figura 45.A).

Veient que les espècies reactives de l'oxigen no eren les responsables de l'augment de GDF15 en resposta al dany mitocondrial, vam explorar si l'estrès de reticle podia estar involucrat en aquesta resposta de GDF15. La inducció de l'estrès de reticle amb el tractament de miotubs amb tunicamicina i tapsigargina (coneguts inductors d'estrès de reticle) va provocar un augment considerable dels nivells d'expressió de GDF15 i d'FGF21 (Taula 12). Malgrat això, a l'analitzar el marcador d'estrès de reticle GRP78 en miotubs tractats amb oligomicina i antimicina A no vam veure canvis en la seva expressió degut als tractaments (Taula 13). Sembla ser, doncs, que el mecanisme de resposta de GDF15 al dany mitocondrial també es independent de l'estrès de reticle, i és encara desconegut.

Taula 12 Efectes de la tunicamicina i de la tapsigargina en els nivells de GDF15 i d'FGF21 en els diferents miotubs. Es van tractar miotubs diferenciats durant 24h amb tunicamicina 1 μ M i amb tapsigargina 1 μ M.

		Nivells d'mRNA d'FGF21 (nivells relatius al control)	Nivells d'mRNA de GDF15 (nivells relatius al control)
Miotubs C2C12	Tunicamicina	18 \pm 1 ***	22 \pm 4 ***
	Tapsigargina	25 \pm 4 ***	21 \pm 2 ***
Miotubs LHCN-M2	Tunicamicina	78 \pm 3 ***	10 \pm 1 ***
	Tapsigargina	99 \pm 6 ***	11 \pm 1 ***

Els valors representen mitjanes \pm S.E.M. (* p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001) en relació amb els controls no tractats.

Taula 13. Efectes dels inhibidors de la cadena respiratòria i dels inductors d'estrès de reticle sobre els nivells de GRP78 en els diferents miotubs. Es van tractar miotubs diferenciats durant 24h amb tunicamicina 1 μ M, amb tapsigargina 1 μ M, amb Oligomicina 0,1 μ M i amb Antimicina A 0,1 μ M.

		Nivells d'mRNA de GRP78 (nivells relatius al control)
C2C12	Oligomicina	1,3 \pm 0,2 n.s.
	Antimicina A	1,4 \pm 0,4 n.s.
	Tunicamicina	18 \pm 2 ***
	Tapsigargina	22 \pm 2 ***
LHCN-M2	Oligomicina	1,2 \pm 0,3 n.s.
	Antimicina A	1,7 \pm 0,4 n.s.
	Tunicamicina	36 \pm 3 ***
	Tapsigargina	41 \pm 2 ***

Les barres representen mitjanes \pm S.E.M. (* p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001) en relació amb els controls no tractats.

GDF15 durant el desenvolupament neonatal i infantil: Relació del guany de pes prenatal i postnatal

Al llarg d'aquesta tesi ja hem vist la creixent importància que esta adquirint el factor GDF15 com a marcador de diverses patologies, i en concret també a nivell de pediatria; acabem de veure els resultats d'un estudi de GDF15 com a marcador de dany mitocondrial en nens, entre d'altres varis estudis que podem trobar. Tot i això, l'ontogènia de GDF15 i el seu potencial valor com a biomarcador d'adipositat i/o estat metabòlic en infants no ha estat estudiat.

En aquest estudi, realitzat gràcies a la col·laboració amb el laboratori de la Dra. Lourdes Ibáñez de l'Hospital Sant Joan de Déu, vàrem analitzar la concentració de GDF15 des del moment del naixement i fins als 24 mesos d'edat en una cohort longitudinal d'infants aparentment sans nascuts amb valors de pes i mida apropiats per l'edat gestacional (AGA- *Appropriate for gestational age*) i d'infants nascuts amb valors inferiors (SGA- *Small for gestational age*). Aquesta última població és coneguda per presentar un major risc d'adipositat central i d'alteracions metabòliques, particularment quan assoleixen el pes que els hi pertoca de forma ràpida. La nostra aportació en l'estudi va ser l'anàlisi dels nivells circulats de GDF15 en aquestes poblacions de nens.

Al mesurar els nivells circulants de GDF15 vam veure que aquests no es veien afectats pel gènere ni pel tipus de part (natural o cesària), així com tampoc pel tipus de nutrició (lactància materna o de fórmula) als 4 mesos d'edat. Els nivells circulants de GDF15 en AGA i SGA al néixer es van trobar més elevats que en la població adulta (Figura 48). No obstant això, els nivells de GDF15 en nounats eren significativament inferiors als de la sang materna durant l'embaràs (12643 ± 154.4 pg/mL, $P < 0,05$). Els nivells de GDF15 disminuïen dramàticament a l'edat de 4 mesos, tot i mantenir-se superiors als dels adults. La disminució dels nivells de GDF15 després del naixement era progressiva, ja que l'anàlisi dels nivells de GDF15 en un grup de nounats de 1-3 dies mostrava uns nivells intermedis entre els nivells de GDF15 al néixer i els nivells als 4 mesos d'edat (2861 ± 319.1 pg/mL). Els nivells de GDF15 s'estabilitzaven, arribant a concentracions trobades en adults, als 24 mesos d'edat (Figura 47). Pel que fa a les diferències entre les poblacions AGA i SGA, els nivells de GDF15 tendien a ser inferiors en la majoria dels temps estudiats, tot i que només arribaven a ser significatius en els 4 mesos d'edat ($p=0.008$). L'anàlisi estadístic d'aquestes dades utilitzant el test *2-way ANOVA*, finalment, mostraven que els canvis longitudinals en els nivells circulants de GDF15 entre els 4 mesos i els 24 mesos d'edat es veien influenciats tant per l'edat ($p < 0.0001$) com pel pes al néixer ($p=0.01$).

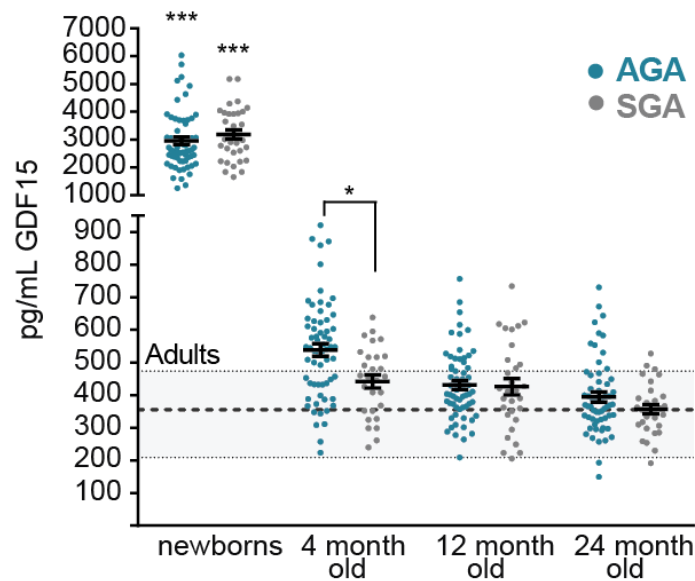


Figura 47. Canvis en els nivells de GDF15 durant el desenvolupament post-natal. Resultats de GDF15 en l'estudi longitudinal d'una població de nens des del moment del naixement i fins als 24 mesos d'edat. (AGA: *appropriate for gestational age*, SGA: *small for gestational age*) La franja grisa marca els valors de GDF15 en la població adulta. Valors representats com a mitjanes \pm S.E.M. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

En el laboratori de la Dra. Lourdes Ibañez van analitzar els paràmetres clínics generals d'aquests nens i van buscar correlacions d'aquests amb els nivells circulants de GDF15. Al moment del naixement, els nounats SGA pesaven menys i eren més petits de mida, presentaven nivells menors d'insulina i d'IGF-1 en el cordó umbilical i menys massa adipocitària i muscular, confirmant estudis anteriors (Díaz et al., 2018; de Zegher et al., 2012a). L'assoliment dels nivells de massa adipocitària que pateixen els SGA als 4 mesos anava acompanyat d'uns nivells més elevats d'IGF-1 i d'adiponectina, en comparació amb els nens AGA; els dos paràmetres essent normalitzats a l'edat de 12 mesos. Als 24 mesos, els nens SGA seguien presentant un pes inferior i nivells inferiors d'insulina (Taula 14).

La taula 15 mostra les correlacions entre els nivells circulants de GDF15 i els paràmetres clínics i bioquímics al llarg del desenvolupament neonatal. Al moment del naixement, els nivells de GDF15 correlacionen negativament amb l'índex ponderal (PI) i amb la concentració d'IGF-1; als 12 mesos d'edat, els nivells circulants de GDF15 van donar correlació negativa amb el PI, i positiva amb l'adiponectina; als 24 mesos, els nivells de GDF15 correlacionen positivament amb els nivells d'HDL i negativament amb el PI, l'insulina, l'HOMA-IR, l'IGF-1 i els triglicèrids. Pel que fa a les diferències entre edats, els nivells de GDF15 circulants correlacionen negativament amb els canvis durant els 0-4, 0-12 i 0-24 mesos amb el PI i l'IGF-1, essent la correlació amb el PI durant els canvis entre els 0 i els 4 mesos, la més significativa ($r = -0.463$; $p = 0.0001$). A més a més, la concentració

de GDF15 circulant correlaciona negativament amb el greix total i el greix abdominal en els canvis entre els 0 i els 24 mesos d'edat.

Taula 14. Dades longitudinals en infants AGA i SGA. Dades recollides dels 0 als 24 mesos d'edat.

	Naixement		4 mesos		12 mesos		Δ 0-12 mesos		24 mesos		Δ 0-24 mesos	
	AGA	SGA	AGA	SGA	AGA	SGA	AGA	SGA	AGA	SGA	AGA	SGA
Auxologia												
edat gestacional (setmanes)	39.7 ± 0.1	38.8 ± 0.3 [§]	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Pes (Kg)	3.3 ± .03	2.3 ± .04 [‡]	6.7 ± 0.1	3.7 ± 0.1 [‡]	9.8 ± 0.2	8.8 ± 0.2 [‡]	6.5 ± 0.2	6.5 ± 0.2	12.1 ± 0.2	11.3 ± 0.2 [‡]	8.8 ± 0.2	8.9 ± 0.2
Llargada (cm)	50.0 ± 0.2	46.2 ± 0.3 [‡]	62.9 ± 0.5	14.6 ± 0.6 [‡]	75.2 ± 0.5	74.3 ± 0.7	25.2 ± 0.5	28.1 ± 0.8 [‡]	85.3 ± 0.7	84.5 ± 0.9	35.3 ± 0.8	38.2 ± 0.9 [‡]
IMC (Kg/m ²)	13.3 ± 0.1	10.9 ± 0.2 [‡]	17.0 ± 0.3	5.4 ± 0.3 [‡]	17.3 ± 0.3	16.0 ± 0.3 [‡]	4.0 ± 0.3	5.1 ± 0.4 [‡]	16.7 ± 0.2	15.6 ± 0.3 [‡]	3.4 ± 0.2	5.0 ± 0.3 [‡]
Variables endocrines - metabòliques												
Glucosa (mg/dl)	83 ± 2	85 ± 6	90 ± 1	4 ± 6	83 ± 1	83 ± 2	0.2 ± 2.6	-2.0 ± 6.5	82 ± 1	81 ± 2	1 ± 3	-4 ± 6
Insulina (mIU/L)	5.9 ± 0.7	3.8 ± 0.9 [§]	7.2 ± 1.1	2.9 ± 1.6	4.2 ± 0.8	3.3 ± 0.8	-1.7 ± 1.0	-0.5 ± 1.3	3.3 ± 0.5	1.7 ± 0.4 [‡]	-2.6 ± 0.9	-1.8 ± 0.9
HOMA-IR	1.2 ± 0.2	1.1 ± 0.3	1.7 ± 0.3	0.4 ± 0.5	0.9 ± 0.2	0.7 ± 0.2	-0.3 ± 0.3	-0.4 ± 0.4	0.7 ± 0.1	0.3 ± 0.1 [‡]	-0.5 ± 0.2	-0.8 ± 0.4
Triglicèrids (mg/dL)	--	--	147 ± 10	--	108 ± 11	83 ± 13	--	--	75 ± 7	82 ± 12	--	--
LDL-C (mg/dL)	--	--	79 ± 3	--	95 ± 4	84 ± 7	--	--	95 ± 3	87 ± 4	--	--
HDL-C (mg/dL)	--	--	38 ± 1	--	36 ± 1	42 ± 3	--	--	43 ± 2	38 ± 3	--	--
IGF-1 (ng/mL)	57 ± 3	38 ± 3 [‡]	40 ± 2	26 ± 9 [‡]	59 ± 4	62 ± 6	2 ± 5	25 ± 5 [‡]	68 ± 4	71 ± 7	10 ± 5	33 ± 5 [‡]
Adiponectina de gran pes molecular (mg/L)	29.9 ± 1.3	29.4 ± 2.6	27.3 ± 1.9	7.5 ± 3.6 [‡]	17.6 ± 1.1	19.9 ± 2.4	-12.3 ± 1.8	-9.6 ± 3.2	17.0 ± 1.3	19.4 ± 2.2	-12.9 ± 2.0	-10.5 ± 4.5
GDF15 (pg/mL)	3095 ± 191	3183 ± 164	555 ± 25	-2714 ± 156	441 ± 16	426 ± 25	-2654 ± 200	-2757 ± 155	394 ± 15	357 ± 14	-2701 ± 196	-2826 ± 164
Composició corporal (DXA)												
Edat en el DXA (dies)	15 ± 1	15 ± 1	131 ± 2	121 ± 3	391 ± 6	409 ± 7	376 ± 6	394 ± 7	748 ± 4	759 ± 25	733 ± 4	744 ± 25
Massa grassa (Kg)	0.8 ± .03	0.5 ± .02 [‡]	2.5 ± 0.1	1.9 ± 0.1	3.4 ± 0.1	3.2 ± 0.1	2.6 ± 0.1	2.7 ± 0.1	3.9 ± 0.1	3.2 ± 0.2 [‡]	3.1 ± 0.1	2.7 ± 0.1
Massa abdominal (Kg)	0.04 ± .002	0.02 ± .002 [‡]	0.14 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.18 ± .01	0.20 ± .04	0.14 ± .01	0.18 ± .04	0.19 ± .01	0.15 ± .01 [‡]	0.15 ± .01	0.13 ± .01
Massa magra (Kg)	3.1 ± .04	2.3 ± .05 [‡]	4.4 ± 0.1	1.6 ± 0.1	6.7 ± 0.1	5.7 ± 0.3 [‡]	3.6 ± 0.1	3.4 ± 0.3	8.5 ± 0.2	7.8 ± 0.2 [‡]	5.4 ± 0.2	5.5 ± 0.2

Els valors representen mitjanes ± S.E.M. *p<0.05, §p<0.01, ‡p<0.001 vs AGA.

Taula 15. Correlacions entre els nivells circulants de GDF15 i paràmetres endocrins i metabòlics en infants AGA i SGA.

	Naixement		4 mesos		Δ 0-4 mesos		12 mesos		Δ 0-12		24 mesos		Δ 0-24	
	r	P	r	p	r	p	r	P	r	P	r	P	r	P
Pes	-0.139	0.173	-0.038	0.720	-0.118	0.269	-0.009	0.929	-0.072	0.501	0.012	0.911	-0.151	0.165
Llargada	-0.107	0.301	-0.093	0.374	0.015	0.887	0.133	0.209	0.038	0.721	0.055	0.609	0.015	0.891
Índex ponderal	-0.231	0.025	0.052	0.615	-0.463	0.0001	-0.209	0.047	-0.234	0.029	-0.315	0.018	-0.308	0.005
Massa grassa	-0.139	0.170	-0.109	0.298	-0.196	0.066	-0.074	0.490	-0.099	0.352	0.077	0.470	-0.294	0.007
M. grassa abdominal	-0.165	0.104	0.019	0.856	-0.189	0.076	-0.064	0.549	-0.043	0.688	-0.015	0.892	-0.293	0.009
Massa magra	-0.148	0.146	0.087	0.407	-0.120	0.261	-0.102	0.345	-0.140	0.193	-0.058	0.591	-0.062	0.570
Insulin	0.107	0.297	0.122	0.260	0.032	0.774	-0.018	0.859	0.177	0.095	-0.289	0.007	0.050	0.645
HOMA-IR	0.115	0.307	0.152	0.151	-0.058	0.609	-0.014	0.897	0.151	0.198	-0.338	0.001	0.134	0.283
IGF-I	-0.303	0.003	-0.124	0.238	-0.323	0.003	-0.071	0.504	-0.289	0.008	-0.284	0.008	-0.270	0.015
Adiponectina de gran pes molecular	0.068	0.503	0.188	0.182	-0.087	0.531	0.293	0.004	-0.014	0.894	0.081	0.547	0.098	0.467
Colesterol-LDL	--	--	0.050	0.710	--	--	-0.102	0.457	--	--	0.121	0.371	--	--
Colesterol-HDL	--	--	0.043	0.749	--	--	-0.106	0.435	--	--	0.376	0.005	--	--
Triglicèrids	--	--	-0.172	0.199	--	--	0.182	0.179	--	--	-0.373	0.007	--	--

GDF15 i FGF21 com a biomarcadors de resposta biològica a un exercici intens: un estudi en corredors de marató

Actualment a les nostres societats cada vegada són més les persones que s'inscriuen a curses de llarga durada i intensitat sense tenir una preparació física suficient i sense sotmetre's a revisions mèdiques específiques. Dins d'aquestes curses, unes de les que han guanyat més popularitat són les maratons (curses de 42,2 km de distància). Durant el desenvolupament d'aquestes curses els corredors pateixen importants alteracions en paràmetres fisiològics; alguns d'ells ja han estat descrits (Bird et al., 2014; Kratz et al., 2002).

En aquesta tesi presentem un estudi en corredors de marató, concretament es tracta de voluntaris que van realitzar la Marató de Barcelona a l'any 2017. En la introducció d'aquesta tesi ja hem vist com la citocina GDF15 respon a diferents situacions d'estrès, tant patològiques com fisiològiques. És per això, doncs, que vam decidir d'estudiar els possibles canvis en els nivells circulants de GDF15 en atletes no professionals després de sotmetre's a una situació d'estrès, com és la realització d'una marató.

L'estudi dels corredors de la Marató de Barcelona del 2017 consisteix en 18 corredors voluntaris, inscrits en aquesta cursa, en els que se'ls va realitzar tres extraccions de sang; una primera realitzada dos dies abans de la cursa, una segona en el moment de la finalització i una última dos dies després d'haver-la realitzat. Aquest projecte, forma part d'un projecte més gran, el projecte SUMMIT, dut a terme per l'Emma Roca (llicenciada bioquímica i esportista d'elit).

Els resultats obtinguts de les mostres de sang extretes abans, després i 48h després de la realització de la cursa indicaven que, immediatament després d'aquesta, els voluntaris presentaven un augment del nombre total de glòbuls blancs associat a un augment del nombre de neutròfils, monòcits i basòfils, així com un nombre reduït de limfòcits i eosinòfils. Aquests canvis es van revertir totalment a les 48 hores després de la cursa, amb valors que no eren estadísticament diferents dels de les condicions basals. De manera similar, també es va trobar un augment significatiu en els nivells d'urea, creatinina, calci, proteïna total, sodi, potassi i bilirubina immediatament després de la cursa; aquests paràmetres també van tornar a nivells similars als anteriors a la cursa, a excepció del potassi, que es va mantenir elevat després de les 48h, i la proteïna total, que va disminuir a nivells inferiors als previs a la realització de la cursa. Els nivells de magnesi i fòsfor disminuïen de forma transitòria després de la cursa i es normalitzaven totalment (magnesi) o parcialment (potassi) 48 hores després. Els nivells de lactat deshidrogenasa (LDH) i troponina, per altra banda, es van induir significativament immediatament després de la cursa i van disminuir a les 48 hores després d'aquesta, aconseguint nivells similars

als basals pel que fa a la troponina, però, restant significativament més elevats en relació amb els basals en el cas de la LDH. Els nivells de creatina quinasa van ser significativament més alts immediatament després de la carrera, i fins i tot van augmentar 48 hores més tard. De fet, els nivells de proteïna alanina aminotransferasa (ALT) i de proteïna c-reactiva es van incrementar en relació amb els basals només en el període d'anàlisi post-carrera de 48 hores (Taula 16).

Taula 16. Paràmetres bioquímics i hematològics dels atletes abans, immediatament després i 48h després d'haver finalitzat la maratón.

	<i>Pre Marató</i>	<i>Post Marató</i>	<i>48h post Marató</i>
<i>Edat (anys)</i>		41.71 ± 1.04	
<i>Pes (Kg)</i>		76.15 ± 1.35	
<i>Glòbuls blancs totals (x10⁹/L)</i>	6.28 ± 0.30	13.55 ± 0.65 ***	5.70 ± 0.30 ###
<i>Glòbuls vermells totals (x10⁶/uL)</i>	5.06 ± 0.10	5.04 ± 0.09	4.89 ± 0.09
<i>Concentració d'hemoglobina corpuscular mitjana (g/dL)</i>	33.25 ± 0.13	33.33 ± 0.11	32.77 ± 0.14 ***
<i>Hemoglobina (g/dL)</i>	14.64 ± 0.21	14.63 ± 0.18	14.02 ± 0.17 *
<i>Hematòcrit (%)</i>	44.06 ± 0.62	43.86 ± 0.54	42.80 ± 0.50
<i>Volum corpuscular mitjà (fL)</i>	87.44 ± 0.91	87.27 ± 0.86	87.83 ± 0.86
<i>Hemoglobina corpuscular mitjana (pg)</i>	29.09 ± 0.37	29.09 ± 0.36	28.81 ± 0.36
<i>Plaquetes (x10³/uL)</i>	188.3 ± 7.34	218.3 ± 10.23*	184.3 ± 7.93 #
<i>Neutròfils (x10⁹/L)</i>	3.47 ± 0.20	11.41 ± 0.60 ***	3.06 ± 0.17 ###
<i>Limfòcits (x10⁹/L)</i>	2.00 ± 0.08	1.16 ± 0.07 ***	1.84 ± 0.11 ###
<i>Monòcits (x10⁹/L)</i>	0.46 ± 0.02	0.78 ± 0.06 ***	0.43 ± 0.03 ###
<i>Eosinòfils (x10⁹/L)</i>	0.16 ± 0.02	0.02 ± 0.007 ***	0.14 ± 0.02 ###
<i>Basòfils (x10⁹/L)</i>	0.02 ± 0.009	0.06 ± 0.01 *	0.01 ± 0.006 ###
<i>Glucosa (mg/dL)</i>	85.96 ± 2.26	85.96 ± 4.11	81.62 ± 2.26
<i>Urea (mg/dL)</i>	35.96 ± 1.80	42.63 ± 1.62 *	35.26 ± 1.47 ##
<i>Creatinina (mg/dL)</i>	0.96 ± 0.02	1.25 ± 0.04 ***	0.93 ± 0.02 ###
<i>Calci (mg/dL)</i>	9.42 ± 0.06	9.92 ± 0.09 ***	9.29 ± 0.06 ###
<i>Magnesi (mmol/L)</i>	2.02 ± 0.03	1.77 ± 0.03 ***	2.05 ± 0.03 ###
<i>Fòsfor (mg/dL)</i>	3.58 ± 0.11	2.86 ± 0.15 ***	3.16 ± 0.09 *
<i>Proteïna total (g/L)</i>	72.72 ± 0.63	76.59 ± 0.76 ***	69.54 ± 0.54 ***##
<i>Sodi (mmol/L)</i>	139.2 ± 0.20	141.9 ± 0.51 ***	139.1 ± 0.26 ###
<i>Potàssi (mmol/L)</i>	4.24 ± 0.05	4.45 ± 0.06 **	4.41 ± 0.05 *
<i>Bilirubina total (mg/dL)</i>	0.69 ± 0.04	0.88 ± 0.04 **	0.72 ± 0.03 #

Resultats

<i>Fosfatasa alcalina (U/L)</i>	74.12 ± 3.07	78.81 ± 3.36	69.0 ± 3.52
<i>Gamma glutamil transferasa (U/L)</i>	20.12 ± 1.65	20.69 ± 1.43	18.62 ± 1.26
<i>Alanina aminotransferasa (U/L)</i>	22.59 ± 1.70	24.44 ± 1.57	33.73 ± 2.71 ****#
<i>Lactat deshidrogenasa (U/L)</i>	186.6 ± 5.03	324.7 ± 14.50 ***	228.7 ± 9.00 ****#
<i>Creatina cinasa (U/L)</i>	170.3 ± 15.58	397.0 ± 28.99 *	802.6 ± 107.1 ****##
<i>Troponina (ng/L)</i>	3.92 ± 0.67	31.88 ± 5.03 ***	5.87 ± 0.88 ###
<i>Proteïna C reactiva (mg/dL)</i>	0.89 ± 0.15	0.64 ± 0.09	6.81 ± 0.78 ****##
<i>Triglicèrids (mg/dL)</i>	105.3 ± 8.85	100.4 ± 5.67	82.15 ± 8.81
<i>Colesterol (mg/dL)</i>	186.3 ± 7.43	185.0 ± 6.60	172.9 ± 6.13
<i>GDF15 (pg/mL)</i>	372.8 ± 21.20	1164 ± 124.7 ***	347.6 ± 15.82 ###
<i>FGF21 (pg/mL)</i>	20.24 ± 7.33	770.3 ± 130.2 ***	39.52 ± 11.77 ###

Els valors representen mitjanes ± S.E.M.

En quant als nivells basals de GDF15 i FGF21 plasmàtic en atletes no professionals abans de la cursa es va trobar que no eren significativament diferents als nivells d'un grup d'individus sedentaris (Figura 48), indicant que el fet d'estar entrenats no influeix en els nivells basals d'aquests dos factors. Immediatament després de la cursa, els nivells de GDF15 i FGF21 en sèrum van incrementar dràsticament en els atletes: un increment de 4,2 vegades en la mitjana dels nivells de GDF15 i un augment de ~ 20 vegades en la dels nivells d'FGF21 (Figura 48). No obstant això, aquest increment va ser notablement diferent entre els diferents atletes (Figura 49). Els nivells plasmàtics de GDF15 i FGF21 es van recuperar, arribant a nivells similars als valors basals a les 48h d'haver finalitzat la cursa.

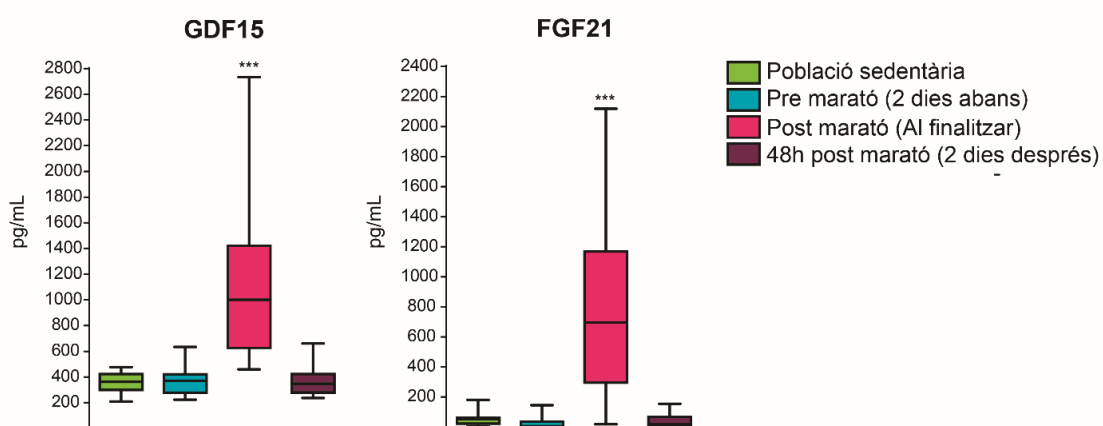


Figura 48. Els nivells circulants de GDF15 i FGF21 augmenten després d'un exercici intens i es recuperen a les 48h d'haver finalitzat. Nivells circulants de GDF15 i FGF21 en una mostra de població adulta sedentària i en corredors de la Marató de Barcelona 2017; dos dies abans de realitzar la cursa, al moment d'acabar-la i 48h més tard. (* p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001).

No vam trobar una correlació positiva ni negativa entre els nivells plasmàtics de GDF15 i FGF21 ni en les condicions basals, ni un cop acabada la cursa ni entre els increments deguts a la cursa. A més a més, tampoc es van trobar correlacions significatives amb el temps dedicat a la cursa, ni amb altres variables relacionades amb la cursa, amb els nivells de GDF15 i FGF21.

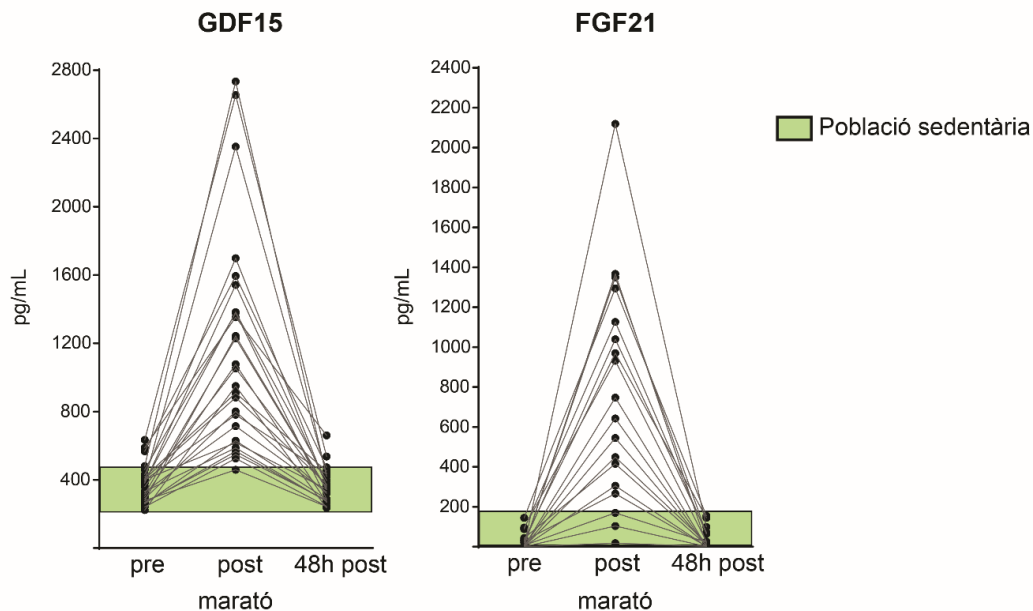


Figura 49. Les magnituds d'inducció de GDF15 i FGF21 després d'una marató són molt variables entre els diferents individus. Nivells circulants de GDF15 i FGF21 en corredors de la Marató de Barcelona 2017; dos dies abans de realitzar la cursa, al moment d'acabar-la i 48h més tard. La franja de color verd marca els nivells circulants en una població sedentària. Les línies marquen un mateix corredor. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Entre els 32 paràmetres fisiològics, bioquímics i hematològics diferents analitzats, els nivells basals de GDF15 es van correlacionar positivament amb els nivells d'ALT (Taula 17). Els nivells de GDF15 immediatament després de la cursa es van correlacionar positivament amb el recompte de glòbuls blancs, amb els nivells de neutròfils, amb els nivells d'urea i amb la proteïna ALT (Taula 18). Les mateixes correlacions significatives es van trobar quan es van analitzar les taxes d'augment individual de GDF15, però també es van trobar correlacions positives addicionals entre l'augment de GDF15 i l'augment dels nivells de monòcits i de la concentració de bilirubina (Taula 20).

Pel que fa a FGF21, es va trobar una correlació positiva entre els seus nivells basals amb els nivells totals de glòbuls blancs, de plaquetes i de monòcits, així com amb els nivells totals de proteïna i amb la proteïna c-reactiva (Taula 17). Els nivells de FGF21 immediatament després de la cursa es van correlacionar negativament amb la glucèmia i els nivells totals de proteïna (Taula 18). Aquestes correlacions significatives no es van observar quan es va analitzar l'augment específic de FGF21 degut a la cursa (Taula 20).

Taula 17. Correlacions entre els diferents paràmetres analitzats en mostres de sang de corredors no professionals abans de realitzar la maratón de Barcelona.

Abans de la cursa	GDF15		FGF21	
	r	p	r	p
GDF15	-	-	-0.302	0.234
FGF21	-0.297	0.232	-	-
Glòbuls blancs totals ($\times 10^9/L$)	0.0148	0.944	0.518	0.028*
Glòbuls vermells totals ($\times 10^6/uL$)	0.0719	0.733	0.169	0.503
Concentració mitjana d'hemoglobina corpuscular (g/dL)	-0.376	0.064	-0.052	0.838
Hemoglobina (g/dL)	-0.119	0.572	-0.001	0.995
Hematòcrit (%)	-0.010	0.962	-0.005	0.984
Volum corpuscular mitjà (fL)	-0.111	0.600	-0.307	0.216
Hemoglobina corpuscular mitjana (pg)	-0.205	0.326	-0.259	0.299
Plaquetes ($\times 10^3/\mu L$)	0.0189	0.930	0.521	0.027*
Neutròfils ($\times 10^9/L$)	0.072	0.734	0.351	0.154
Limfòcits ($\times 10^9/L$)	-0.090	0.669	0.466	0.051
Monòcits ($\times 10^9/L$)	-0.160	0.445	0.534	0.023*
Eosinòfils ($\times 10^9/L$)	-0.003	0.989	0.078	0.760
Basòfils ($\times 10^9/L$)	0.039	0.853	0.452	0.060
Glucosa (mg/dL)	-0.276	0.181	-0.146	0.562
Urea (mg/dL)	0.186	0.373	-0.520	0.027*
Creatinina (mg/dL)	-0.227	0.275	-0.310	0.211
Calci (mg/dL)	0.132	0.531	0.189	0.454
Magnesi (mmol/L)	0.024	0.908	-0.008	0.976
Fòsfor (mg/dL)	-0.043	0.839	-0.255	0.308
Proteïna total (g/L)	0.061	0.772	0.612	0.007**
Sodi (mmol/L)	0.125	0.551	-0.168	0.506
Potassi (mmol/L)	-0.020	0.926	0.093	0.714
Bilirubina total (mg/dL)	-0.234	0.259	0.123	0.626
Fosfatasa alcalina (U/L)	0.003	0.989	-0.152	0.548
Gamma glutamil transferasa (U/L)	0.073	0.730	-0.042	0.869
Alanina aminotransferasa (U/L)	0.438	0.029*	-0.280	0.260
Lactat deshidrogenasa (U/L)	0.211	0.311	-0.301	0.218
Creatina cinasa (U/L)	0.242	0.244	-0.181	0.473
Troponina (ng/L)	-0.044	0.834	0.185	0.464
Proteïna C reactiva (mg/dL)	-0.039	0.852	0.617	0.006**
Triglicèrids (mg/dL)	-0.241	0.247	0.337	0.172
Colesterol (mg/dL)	-0.021	0.920	0.075	0.768

*p<0.05, **p<0.01

Taula 18. Correlacions entre els diferents paràmetres analitzats en mostres de sang de corredors no professionals immediatament després de realitzar la marató de Barcelona.

<i>Després de la cursa</i>	<i>GDF15</i>		<i>FGF21</i>	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
<i>GDF15</i>	-	-	0.394	0.106
<i>FGF21</i>	0.394	0.106	-	-
<i>Glòbuls blancs totals (x10⁹/L)</i>	0.455	0.022*	0.93	0.237
<i>Glòbuls vermells totals (x10⁶/uL)</i>	-0.067	0.751	-0.237	0.343
<i>Concentració mitjana d'hemoglobina corpuscular (g/dL)</i>	-0.129	0.539	0.061	0.811
<i>Hemoglobina (g/dL)</i>	-0.054	0.799	-0.202	0.422
<i>Hematòcrit (%)</i>	-0.015	0.942	-0.217	0.387
<i>Volum corpuscular mitjà (fL)</i>	0.113	0.591	0.149	0.555
<i>Hemoglobina corpuscular mitjana (pg)</i>	0.058	0.782	0.134	0.596
<i>Plaquetes (x10³/uL)</i>	0.084	0.689	0.374	0.126
<i>Neutròfils (x10⁹/L)</i>	0.506	0.010**	0.314	0.205
<i>Limfòcits (x10⁹/L)</i>	-0.225	0.279	-0.059	0.816
<i>Monòcits (x10⁹/L)</i>	0.326	0.112	0.319	0.198
<i>Eosinòfils (x10⁹/L)</i>	-0.368	0.071	-0.152	0.547
<i>Basòfils (x10⁹/L)</i>	0.241	0.247	0.050	0.843
<i>Glucosa (mg/dL)</i>	-0.136	0.518	-0.470	0.049*
<i>Urea (mg/dL)</i>	0.661	0.0003***	0.004	0.989
<i>Creatinina (mg/dL)</i>	0.349	0.087	0.103	0.684
<i>Calci (mg/dL)</i>	0.122	0.560	0.155	0.539
<i>Magnesi (mmol/L)</i>	0.062	0.770	-0.038	0.881
<i>Fòsfor (mg/dL)</i>	-0.129	0.541	-0.461	0.055
<i>Proteïna total (g/L)</i>	0.140	0.504	0.479	0.044*
<i>Sodi (mmol/L)</i>	-0.166	0.429	-0.069	0.786
<i>Potassi (mmol/L)</i>	0.373	0.066	0.212	0.398
<i>Bilirubina total (mg/dL)</i>	0.214	0.305	-0.054	0.832
<i>Fosfatasa alcalina (U/L)</i>	0.230	0.268	-0.238	0.341
<i>Gamma glutamil transferasa (U/L)</i>	-0.064	0.761	0.325	0.189
<i>Alanina aminotransferasa (U/L)</i>	0.498	0.011*	0.240	0.338
<i>Lactat deshidrogenasa (U/L)</i>	0.1574	0.452	0.156	0.536
<i>Creatina cinasa (U/L)</i>	-0.227	0.275	-0.382	0.118
<i>Troponina (ng/L)</i>	0.142	0.498	-0.236	0.345
<i>Proteïna C reactiva (mg/dL)</i>	0.011	0.958	0.176	0.485
<i>Triglicèrids (mg/dL)</i>	0.162	0.439	0.304	0.220
<i>Colesterol (mg/dL)</i>	-0.219	0.292	-0.255	0.308

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

Resultats

Taula 19. Correlacions entre els diferents paràmetres analitzats en mostres de sang de corredors no professionals 48h després de realitzar la marató de Barcelona.

48h després de la cursa	GDF15		FGF21	
	r	p	r	p
GDF15	-	-	-0,012	0,963
FGF21	-0.012	0.963	-	-
Glòbuls blancs totals ($\times 10^9/L$)	0.183	0.381	0,133	0,598
Glòbuls vermells totals ($\times 10^6/uL$)	0.147	0.482	-0,127	0,615
Concentració mitjana d'hemoglobina corpuscular (g/dL)	-0.110	0.600	-0,112	0,659
Hemoglobina (g/dL)	-0.060	0.774	-0,123	0,628
Hematòcrit (%)	-0.008	0.970	-0,093	0,712
Volum corpuscular mitjà (fL)	-0.233	0.261	0,118	0,641
Hemoglobina corpuscular mitjana (pg)	-0.224	0.282	0,047	0,854
Plaquetes ($\times 10^3/\mu L$)	0.093	0.657	0,1314	0,6033
Neutròfils ($\times 10^9/L$)	0.246	0.235	0,155	0,539
Limfòcits ($\times 10^9/L$)	-0.041	0.846	-0,009	0,971
Monòcits ($\times 10^9/L$)	-0.038	0.856	0,055	0,830
Eosinòfils ($\times 10^9/L$)	0.004	0.984	0,026	0,918
Basòfils ($\times 10^9/L$)	0.361	0.076	0,133	0,600
Glucosa (mg/dL)	0.234	0.260	-0,424	0,080
Urea (mg/dL)	0.019	0.929	-0,364	0,138
Creatinina (mg/dL)	-0.168	0.422	-0,490	0,039*
Calci (mg/dL)	-0.071	0.735	-0,094	0,710
Magnesi (mmol/L)	-0.064	0.761	0,264	0,290
Fòsfor (mg/dL)	-0.375	0.065	0,118	0,641
Proteïna total (g/L)	-0.306	0.136	0,377	0,123
Sodi (mmol/L)	-0.072	0.734	0,081	0,749
Potassi (mmol/L)	-0.076	0.720	-0,148	0,558
Bilirubina total (mg/dL)	-0.139	0.508	-0,169	0,502
Fosfatasa alcalina (U/L)	0.041	0.844	-0,063	0,803
Gamma glutamil transferasa (U/L)	-0.124	0.556	0,503	0,034*
Alanina aminotransferasa (U/L)	-0.217	0.298	0,343	0,164
Lactat deshidrogenasa (U/L)	-0.354	0.083	0,268	0,282
Creatina cinasa (U/L)	-0.312	0.129	0,332	0,179
Troponina (ng/L)	-0.016	0.939	-0,203	0,420
Proteïna C reactiva (mg/dL)	0,054	0,797	0,139	0,583
Triglicèrids (mg/dL)	-0,029	0,889	0,337	0,172
Colesterol (mg/dL)	-0,093	0,659	0,126	0,618

*p<0.05

Taula 20. Correlacions entre les induccions dels paràmetres analitzats en mostres de sang de corredors no professionals en resposta a la realització de la marató de Barcelona.

(Nivells després-nivells abans de la cursa)	GDF15		FGF21	
	r	p	r	p
GDF15	-	-	0.386	0.114
FGF21	0.386	0.114	-	-
Glòbuls blancs totals ($\times 10^9/L$)	0.535	0.0059**	0.345	0.161
Glòbuls vermells totals ($\times 10^6/uL$)	0.339	0.098	0.117	0.645
Concentració mitjana d'hemoglobina corpuscular (g/dL)	-0.127	0.545	0.244	0.329
Hemoglobina (g/dL)	0.276	0.181	0.141	0.577
Hematòcrit (%)	0.307	0.135	0.080	0.751
Volum corpuscular mitjà (fL)	-0.098	0.641	-0.159	0.530
Hemoglobina corpuscular mitjana (pg)	-0.258	0.213	0.178	0.479
Plaquetes ($\times 10^3/\mu L$)	0.171	0.414	0.124	0.625
Neutròfils ($\times 10^9/L$)	0.571	0.003**	0.372	0.128
Limfòcits ($\times 10^9/L$)	-0.158	0.452	-0.347	0.158
Monòcits ($\times 10^9/L$)	0.458	0.021*	0.401	0.100
Eosinòfils ($\times 10^9/L$)	0.012	0.956	0.062	0.807
Basòfils ($\times 10^9/L$)	0.227	0.275	-0.190	0.450
Glucosa (mg/dL)	-0.052	0.806	-0.182	0.469
Urea (mg/dL)	0.548	0.005**	0.175	0.489
Creatinina (mg/dL)	0.387	0.056	0.274	0.272
Calci (mg/dL)	0.156	0.457	0.142	0.575
Magnesi (mmol/L)	0.167	0.425	-0.224	0.371
Fòsfor (mg/dL)	-0.106	0.613	-0.452	0.060
Proteïna total (g/L)	0.218	0.295	0.254	0.310
Sodi (mmol/L)	-0.239	0.251	-0.117	0.645
Potassi (mmol/L)	0.224	0.282	0.343	0.163
Bilirubina total (mg/dL)	0.477	0.016*	0.259	0.299
Fosfatasa alcalina (U/L)	0.045	0.830	-0.047	0.853
Gamma glutamil transferasa (U/L)	-0.178	0.395	-0.211	0.400
Alanina aminotransferasa (U/L)	0.097	0.643	0.126	0.619
Lactat deshidrogenasa (U/L)	0.106	0.613	0.175	0.487
Creatina cinasa (U/L)	0.2994	0.146	-0.323	0.192
Troponina (ng/L)	0.160	0.444	-0.227	0.366
Proteïna C reactiva (mg/dL)	0.206	0.322	-0.239	0.340
Triglicèrids (mg/dL)	0.287	0.165	0.146	0.564
Colesterol (mg/dL)	0.117	0.578	0.029	0.910

*p<0.05, **p<0.01

DISCUSSION

Part 1. Estudis experimentals en models animals i cel·lulars: Paper de GDF15 com a adipoquina marró.

En aquesta tesi, s'ha identificat el factor GDF15 com una adipoquina marró o batoquina, alliberada pels adipòcits marrons i beix en resposta a l'activació termogènica d'aquestes cèl·lules. Prèviament, s'havia descrit un augment de la inducció de GDF15 en el teixit adipós marró en resposta a un estímul de fred (Verdeguer et al., 2015). Verdeguer et al. van descriure un augment dels nivells d'mRNA de GDF15 en el teixit adipós marró en resposta a l'exposició al fred. En l'estudi realitzat en aquesta tesi, confirmem aquests resultats i mostrem, a més a més, una inducció dels nivells de proteïna en el TAM en resposta a l'estímul de fred, així com un augment tant en els nivells d'mRNA com de proteïna en el teixit adipós blanc en resposta a l'exposició al fred. Això ens indicà una relació de GDF15 amb l'activitat del teixit adipós marró així com en relació al *browning* del teixit adipós blanc. Addicionalment, identifiquem els adipòcits marrons i beix com les cèl·lules responsables d'aquest augment en els nivells de GDF15, i observem la secreció de GDF15 al medi per part d'aquestes cèl·lules adipocitàries. Recentment s'ha començat a estudiar el paper del teixit adipós marró com a òrgan secretor, capaç de secretar proteïnes que, amb acció autocrina, paracrina o endocrina, estan implicades en la coordinació de la resposta termogènica adaptativa (Villarroya et al., 2016). Així doncs, la proteïna GDF15, secretada per part dels adipòcits marrons i beix en resposta a un estímul de fred, és una nova potencial batoquina.

Al estudiar la via de senyalització responsable de la regulació de GDF15, la via β 3-adrenèrgica va resultar ser la responsable de l'augment de l'expressió i secreció de GDF15 en resposta a l'estímul termogènic. El fet que l'AMPc directament indueixi l'expressió de GDF15 i la implicació observada de la proteïna cinasa A (PKA) indiquen una connexió entre el senyal noradrenèrgic i la coneguda via intracel·lular AMPc/PKA de regulació de l'expressió gènica del programa d'inducció termogènica de l'adipòcit marró. L'observació de la regulació directa de la transcripció del promotor del gen GDF15 per AMPc i PKA confirmà aquesta via de regulació de GDF15 a nivell transcripcional. En resum, aquest conjunt de dades identifica al gen GDF15 com a part del programa d'inducció termogènica de l'adipòcit marró, en tant que comparteix els reguladors comuns dels gens clau de la termogènesi, com per exemple UCP1.

L'observació que hem realitzat de que, a més de secreció de GDF15, existeixi una gran acumulació de GDF15 intracel·lular sota estímul termogènic, incloent la localització nuclear, és consistent amb un possible paper intracel·lular de GDF15, diferent del paper de la proteïna secretada. De fet, existeix un estudi previ que indica que formes

intracel·lulars, no secretades, de GDF15, actuen dins la cèl·lula i específicament controlen l'expressió gènica actuant a nivell de nucli cel·lular (Min et al., 2015). Vist això, s'hauria de seguir investigant per tal de determinar aquestes possibles funcions intracel·lulars de GDF15 en el cas dels adipòcits marrons.

Hem observat que el factor FGF21 és necessari per l'expressió i secreció de GDF15 en els adipòcits marrons i beix. FGF21 és una adipoquina marró (tot i poder també ser secretada per altres teixits com el fetge) amb acció local i sistèmica, també regulada per estímuls noradrenèrgics en aquests adipòcits (Hondares et al., 2011). Hem observat que la proteïna FGF21 i la proteïna GDF15 s'indueixen en paral·lel en el teixit adipós marró i en els adipòcits marrons en resposta a l'estímul termogènic. Aquesta inducció paral·lela de GDF15 i FGF21 s'ha observat en altres teixits sota condicions fisiopatològiques diferents; en aquesta tesi s'ha observat també en l'estudi dels efectes de l'exercici en humans i en l'estudi pediàtric en patologia mitocondrial (veure Discussió més endavant). Aquest paral·lelisme també el trobem en la literatura, per exemple en condicions d'estrès de reticle endoplasmàtic en el fetge (Kim et al., 2015; Xu et al., 2006). La mecànica intracel·lular per la qual les accions possiblement autocrines d'FGF21 són capaces de controlar la inducció de GDF15 en resposta a l'estímul termogènic hauran de ser clarificades en el futur, així com possiblement establir si això és quelcom únic de l'adipòcit marró o és compartit per altres cèl·lules productores, alhora, de GDF15 i FGF21, com els hepatòcits.

Recentment, es va publicar el descobriment del receptor de GDF15 en el cervell, GFRAL (Emmerson et al., 2017; Hsu et al., 2017; Mullican et al., 2017; Yang et al., 2017). Aquests estudis postulen un efecte central dels nivells de GDF15 circulants sobre la ingesta d'aliments, actuant com a factor anorexigènic. En resposta a un estímul termogènic, tot i augmentar els nivells de proteïna GDF15 dins del teixit i la secreció d'aquesta per part dels adipòcits marrons, no vam trobar alterats els nivells circulants de GDF15. Aquest fet podria ser degut a una disminució en paral·lel de la secreció de GDF15 per part del fetge, tot i que això s'hauria de comprovar. Altrament, la manca de repercussió de l'augment d'expressió de GDF15 en el TAM en els nivells circulants de GDF15 en condicions d'estímul termogènic és compatible amb la consideració de GDF15 com a factor anorexigènic. Resultaria contradictori un augment de GDF15 en situacions d'activació termogènica del TAM, com és el fred ambiental, ja que l'exposició al fred provoca un augment adaptatiu en la ingesta d'aliments per part dels ratolins i no seria coherent que es produís un augment de GDF15 en aquest context. No obstant, cal dir que, hi ha situacions patològiques, com alguns tipus de càncer amb caquèxia associada on existeix una relació coherent entre els efectes centrals anorexigènics de GDF15 al donar-se alhora nivells alts de GDF15 i inhibició de la gana. No obstant, en condicions fisiològiques això no es

produeix sempre. Per exemple, en la gestació, una situació clarament hiperfàgica, els nivells circulants de GDF15 estan fortament augmentats (Moore et al., 2000). Caldrà investigar en el futur si l'acció anorexigènica de GDF15 es produeix de fet només en condicions patològiques o també en condicions fisiològiques on hi ha canvis en els nivells d'ingesta.

La manca de canvis en els nivells circulants de GDF15 en resposta a un estímul termogènic (suggeridor de no haver-hi un possible rol endocrí), així com la manca d'efectes en els adipòcits marrons en resposta a un tractament amb GDF15 recombinant (suggeridor de no haver-hi un possible rol autocrí), reforcen la possibilitat de que la secreció de GDF15 tingui majoritàriament efectes paracrins dins del mateix teixit. Efectivament, hem observat que el GDF15 produït pels adipòcits marrons actua sobre els macròfags reprimint la inflamació. Estudis recents posen de manifest que l'activitat pro-inflamatòria dels macròfags que infiltren el TAM exerceixen efectes repressors sobre l'activació termogènica d'aquest teixit (Villarroya et al., 2018b). Recentment, han estat identificats per primer cop factors secretats pels adipòcits marrons i beix (específicament la quimiocina CXCL14) en resposta a l'activació termogènica, que actuen directament sobre els macròfags infiltrats en el teixit. CXCL14 afavoreix la termogènesi a través del reclutament i l'activació de macròfags amb activació alternativa, no-inflamatòria (fenotip M2) als teixits adiposos blanc i marró (Cereijo et al., 2018). Estudis previs del nostre laboratori havien indicat que el secretoma dels adipòcits marrons inhibia l'activitat pro-inflamatòria dels macròfags (dada confirmada independent per (Dowal et al., 2017)) però que la quimiocina CXCL14 no n'era la responsable. Les nostres dades en aquesta tesi han permès identificar el GDF15 secretat pels adipòcits marrons com a factor implicat en aquesta acció anti-inflamatòria del secretoma dels adipòcits marrons.

Sabent que la reducció de l'estatus inflamatori local del TAM s'associa a una activació termogènica i que hi ha altres factors secretats pel TAM afavorint la termogènesi a través d'una acció en els macròfags del teixit, els efectes observats de GDF15 sobre els macròfags residents en aquest teixit podrien explicar l'acció positiva de la sobreexpressió de GDF15 *in vivo* sobre l'activitat del TAM (Chrysovergis et al., 2014).

Per altra banda, l'efecte de GDF15 sobre els macròfags reforça la presència d'accions perifèriques d'aquesta proteïna, possiblement independents dels receptors GFRAL, i és consistent amb altres estudis que mostren una acció perifèrica d'aquesta proteïna en altres tipus cel·lulars. Ja des del descobriment de GDF15, trobem publicat un estudi on descriuen un efecte de GDF15 sobre els macròfags reprimint l'expressió del factor TNF α (Bootcov et al., 1997). Anys més tard, es descriu altra vegada aquest efecte inhibitori de GDF15 en macròfags residents en el teixit adipós blanc (Jung et al., 2018; Lee et al., 2017). Addicionalment, trobem altres estudis parlant d'accions perifèriques de GDF15 en altres

tipus cel·lulars diferents (Artz et al., 2016; Xu et al., 2006). Per ara no està ben establert el receptor mitjancer de l'acció perifèrica, no cerebral, de GDF15, encara que s'ha postulat que es podria tractar dels *transforming growth factor β receptor I* (TGF- β RI) i *TGF- β receptor II* (TGF- β RII) (Artz et al. 2016). Estudis futurs seran necessaris per aclarir aquesta qüestió.

Així doncs, el nostre estudi confirmaria que GDF15, a part d'actuar a nivell central com a factor anorexigènic, també actua a nivell perifèric, amb funcions completament diferents.

En resum, els resultats de la present tesi, així, suggereixen que la secreció de GDF15 per part dels adipòcits marrons pot ser un mecanisme per regular localment l'activitat pro-inflamatòria dels macròfags del teixit adipós marró associada amb una millora de l'activitat d'aquest teixit.

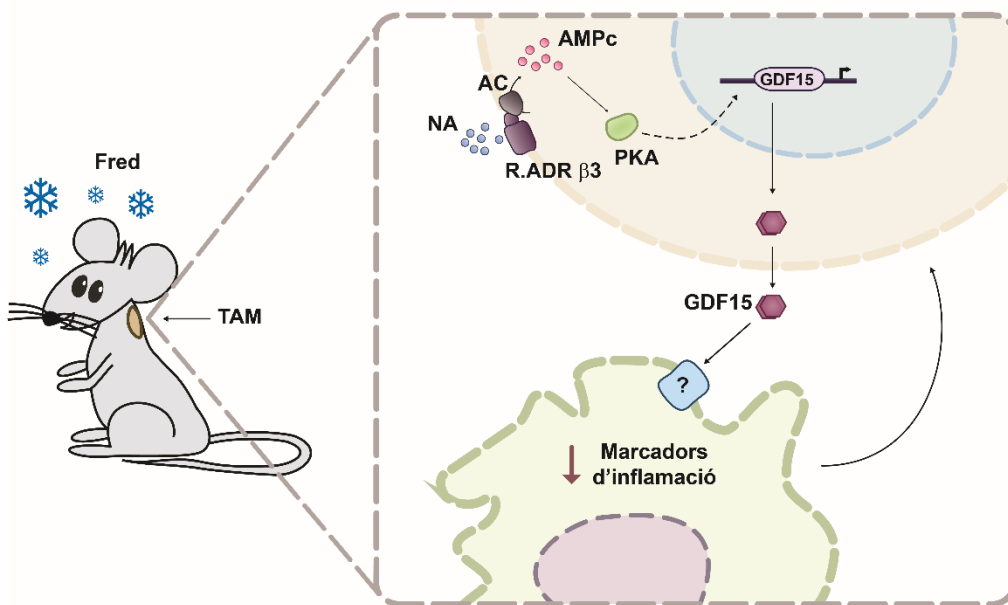


Figura 50. Model d'acció proposat per a GDF15 en resposta a l'activació termogènica en el teixit adipós marró.

Part 2. Estudis en humans

Estudi de GDF15 com a biomarcador de patologia mitocondrial en població pediàtrica

En aquest estudi vam comparar els nivells circulants de GDF15 i d'FGF21 en una cohort de nens diagnosticats de patologia mitocondrial que incloïa tant mutacions en el DNA nuclear com mutacions en el DNA mitocondrial.

Just abans d'enviar l'estudi per publicar, un altre laboratori va publicar un estudi on mostraven valors augmentats de GDF15 en una cohort d'adults amb mutacions en el DNA mitocondrial (Yatsuga et al., 2015). El nostre estudi difereix de l'anterior en que en aquest ens vam centrar en una població de nens de menys de 18 anys, en que es va estudiar pacients tant amb mutacions en el DNA mitocondrial com en el DNA nuclear amb un ampli rang de fenotips, i en que vam analitzar aquests dos factors a nivell *in vitro* en miotubs tant provinents de ratolí com humans.

Els resultats indicaven que GDF15 és un biomarcador sensible i específic pel diagnòstic d'aquest grup de malalties genètiques complexes, augmentant els seus nivells circulants de forma molt elevada en pacients amb aquestes patologies. Addicionalment, vam observar com la combinació de la determinació dels nivells de GDF15 i FGF21 és més eficient per identificar aquests pacients en comparació amb els dos factors per separat. Aquesta estratègia podria ser utilitzada per seleccionar els pacients per a la realització d'anàlisis genètics, encara molt cars i no disponibles en tots els centres.

Els nivells de GDF15 en circulació trobats ens els pacients de patologia mitocondrial eren similars a valors publicats en altres estudis (Fujita et al., 2015; Kalko et al., 2014; Yatsuga et al., 2015). Els pacients que presentaven uns nivells de GDF15 més elevats eren aquells amb mutacions en el gen de la TK2, pacients de MELAS i amb mutacions en el gen MT-TL1 i pacients amb delecions en el DNA mitocondrial.

La inducció de GDF15 en resposta al tractament amb inhibidors de la cadena respiratòria en cèl·lules musculars indicava, així com en el cas d'FGF21, que el fet de bloquejar la cadena respiratòria és un estímul potent per l'expressió i secreció d'aquests dos factors. Aquestes observacions aporten un gran suport a les dades trobades en humans, tot indicant que molt possiblement són les cèl·lules musculars les responsables de l'augment de GDF15 en resposta al dany mitocondrial observat en circulació en els pacients. En el cas d'FGF21, és conegut que les espècies reactives de l'oxigen juguen un paper important en la inducció d'aquest factor front a aquest dany, i que amb un tractament antioxidant es bloqueja aquesta inducció (Ribas et al., 2014). Contràriament, el tractament amb antioxidant no fou capaç de bloquejar la inducció de GDF15 en resposta al dany

mitocondrial. Aquests resultats no exclouen la implicació de l'estrès oxidatiu en la regulació de l'expressió de GDF15 en altres tipus cel·lular i sota altres condicions (Dominguez-Rodriguez et al., 2011), però indiquen que els mecanismes intracel·lulars de senyalització retrògrada mitocondrial en aquestes cèl·lules són diferents per als gens GDF15 i FGF21. La regulació de GDF15 en aquestes cèl·lules i condicions no es donaria a través de l'estrès oxidatiu, podent donar-se, per exemple, a través de l'estrès de reticle (Park et al., 2012). Tot i això, i havent observat que fàrmacs inductors d'estrès de reticle provoquen un augment dels nivells de GDF15, el tractament amb els inhibidors de la cadena respiratòria, a les concentracions utilitzades en l'estudi, no van provocar un augment de l'estrès de reticle. Aquests resultats, doncs, indicarien una via de senyalització diferent i encara desconeguda com a responsable de la inducció de GDF15 en resposta al dany mitocondrial en miotubs.

En resum, en el present estudi s'ha mostrat que GDF15 pot ser un bon candidat de biomarcador per ajudar en el diagnòstic de nens amb sospites de patologia mitocondrial, i que la combinació dels factors GDF15 i FGF21 permeten una millor selecció dels pacients que s'haurien de sotmetre a probes bioquímiques i genètiques de diagnòstic. Tot i això, són necessaris més estudis per tal d'entendre el mecanisme de regulació de GDF15 sota condicions de disfunció mitocondrial i estrès cel·lular.

GDF15 durant el desenvolupament neonatal i infantil: Relació del guany de pes prenatal i postnatal

Gràcies a la col·laboració amb el laboratori de la Dra. Lourdes Ibáñez de l'Hospital Sant Joan de Déu, en aquesta tesi vam poder avaluar els canvis longitudinals dels nivells circulants de GDF15 durant els dos primers anys de vida en lactants sans, nascuts amb un pes adequat i nascuts amb un pes inferior a l'adequat. Aquest és el primer estudi sobre l'evolució dels nivells circulants de GDF15 durant aquesta etapa del desenvolupament en humans.

Al analitzar els nivells de GDF15 vam trobar que aquests estaven molt elevats al moment del naixement i queien dràsticament a l'edat de 4 mesos, essent aquesta caiguda més pronunciada en el cas dels infants nascuts amb un pes inferior a l'adequat. Als 24 mesos d'edat els nivells de GDF15 ja eren els presents en individus adults.

En el moment del naixement els nivells circulants de GDF15 eren comparables entre les dues poblacions d'infants, representant només un 25% dels nivells circulants presents en la sang materna durant el final de la gestació (Kaitu'u-Lino et al., 2013), i aproximadament unes 10 vegades superiors que la cohort d'adults analitzada. Tot i la petita mida de la

població adulta analitzada, els valors trobats de GDF15 eren similars a valors publicats en poblacions més nombroses (Tsai et al., 2015; Wollert et al., 2017). Els nivells de GDF15 en les mostres de cordó umbilical eren similars a valors publicats en nounats amb valors de pes al néixer o edat gestacional sense especificar (Sugulle et al., 2009), i posteriorment disminuïen lleugerament.

La placenta secreta grans quantitats de GDF15 (Segerer et al., 2012) i els nivells de GDF15 en sang de mare gestant se sap que son molt elevats (Moore et al., 2000). Això es va comprovar en mares gestants de la cohort de nadons analitzats i es va trobar que els nivells de GDF15 materns eren 4 vegades més alts que en sang de cordó umbilical. No obstant, en observar que a les 36h de vida els nivells de GDF15 segueixen sent considerablement elevats, i el fet de que GDF15 presenti una vida mitja curta (Xiong et al., 2017), suggereix un origen neonatal i no de la placenta o matern dels nivells relativament alts de GDF15 en els nounats.

A l'edat de 4 mesos, les concentracions circulants de GDF15 disminuïen dràsticament en els infants; aquesta caiguda era dependent del creixement prenatal, pel fet de ser molt més evident pels infants nascuts amb un pes inferior al adequat. Aquestes diferències ens apuntaven a un regulació programada en el desenvolupament que podria contribuir en part a la regulació de l'assoliment del pes adequat per part dels individus nascuts amb un pes inferior. De fet, un pes inferior al moment del naixement seguit d'un ràpid guany de pes esta associat a un menor gruix de la caròtida als 12 mesos d'edat, a més greix visceral als 24 mesos d'edat, a un augment en els nivells d'IGF-1 i a uns nivells inferiors d'adiponectina a l'edat de 3 anys, així com a una resistència a la insulina i a un excés de greix visceral hepàtic a l'edat de 6 anys i a un major risc de patir obesitat i diabetis en l'edat adulta (Barker et al., 1993; Leunissen et al., 2009; Sebastiani et al., 2016; Wang et al., 2016).

Com ja s'ha comentat en aquesta tesi, el factor GDF15 esta guanyant rellevància com a factor regulador de l'homeòstasi energètica i de la inflamació en adults (Chung et al., 2017a; Mullican and Rangwala, 2018; Tsai et al., 2013), i estudis recents parlen d'un efecte central anorexigènic d'aquest factor (Tsai et al., 2015, 2018). L'observació d'uns nivells circulants de GDF15 inferiors en aquells infants nascuts amb un pes inferior a l'adequat seria coherent amb una disminució de l'acció inhibidora d'aquesta citocina sobre els canvis d'alimentació i sobre la despesa energètica durant el període en que es produeix la recuperació de pes (Hokken-Koelega et al., 1995) i, per tant, quan s'espera un augment paral·lel de la ingesta calòrica.

Els canvis en els nivells circulants de GDF15 durant el desenvolupament neonatal van correlacionar negativament amb els canvi en els nivells de IGF-1, un marcador anabòlic

(Rosenfeld and Hwa, 2009). La correlació positiva entre els nivells de GDF15 i els nivells d'adiponectina a l'edat de 12 mesos, juntament amb la correlació negativa entre GDF15 i marcadors de sensibilitat a la insulina als 24 mesos, recolzen la relació entre uns nivells inferiors de GDF15 durant la infantesa i el desenvolupament d'un estat metabòlic advers.

Fins a l'estudi d'aquesta tesi, els nivells circulants de GDF15 només s'havien analitzat i identificat com a anormalment alts en estudis de patologies greus, com trastorns neuromusculars d'origen mitocondrial (Montero et al., 2016), hipertensió pulmonar secundària a malalties congènites del cor (Li et al., 2017) o anèmia de cèl·lules falciformes (Tantawy et al., 2014). Tot i això, s'ha d'anar amb compte amb els nivells baixos de GDF15 observats en infants aparentment sans nascuts amb un pes inferior a l'adequat, ja que un permanent nivell baix de GDF15 podria estar associat al desenvolupament d'obesitat i d'altres problemes metabòlics en un futur. En aquest sentit, s'ha descrit com l'administració de GDF15 a ratolins protegeix front la progressió de la esteatohepatitis (Kim et al., 2018), i augmenta l'expressió de gens termogènics i lipolítics tant en el teixit adipós blanc com marró (Chrysovergis et al., 2014). Per contra, i com ja hem vist en aquesta tesi, la deficiència de GDF15 promou la obesitat i les comorbiditats associades (Tran et al., 2018).

En resum, les primeres setmanes de vida estan associades a uns nivells de GDF15 més elevats en relació a l'etapa adulta. Els nadons nascuts amb un pes inferior a l'adequat mostren uns nivells inferiors de GDF15 a l'edat de 4 mesos que poden ser en part responsables de la promoció de la ingesta d'aliments associada a l'assoliment del pes adequat. S'hauria d'ampliar l'estudi analitzant els mateixos infants en un termini més llarg de temps per determinar els possibles efectes en el risc de patir malalties com l'obesitat i la diabetis.

GDF15 i FGF21 com a biomarcadors de resposta biològica a un exercici intens: un estudi en corredors de marató

L'estudi amb corredors de marató realitzat en aquesta tesi ha suposat una oportunitat única per estudiar el paper de GDF15 com a biomarcador d'exercici intens continuat (i estrès metabòlic i funcional associat) en humans.

En general, el perfil d'alteracions dels paràmetres de la sang observats en els individus del nostre estudi és molt concordant amb els resultats obtinguts en estudis anteriors sobre la resposta fisiològica a la marató. Així, hem confirmat un augment dels nivells de proteïna total, urea, creatinina, bilirubina, creatina quinasa, lactat deshidrogenasa i troponina després de la cursa, com trobem publicat en altres estudis realitzats en corredors de marató (Bird et al., 2014) i coherents amb un escenari de lesions musculars i esforços.

Alguns d'aquests paràmetres van tornar als valors basals poc després (48 hores) de la cursa, mentre que d'altres, com la creatina quinasa, la lactat deshidrogenasa i la troponina, no ho van fer, també concordant amb estudis previs (Bird et al., 2014; Kobayashi et al., 2005). També vam confirmar l'augment del recompte total de glòbuls blancs, principalment a causa de l'augment en el nombre de neutròfils i de monòcits (Kratz et al., 2002; Reid et al., 2004), normalment atribuït a una reacció inflamatòria front a les micro-lesions dels teixits (muscular o potser també altres) provocada per la cursa.

Un primer descobriment interessant en el nostre estudi és el perfil comú de potent inducció dels nivells de GDF15 i FGF21 en sang immediatament després de l'exercici associat a la cursa de la marató i el retorn als nivells normals a les 48 hores després. La magnitud d'aquesta inducció, però, va resultar ser molt variable entre els diferents individus, i no es va trobar associació entre el grau d'aquesta inducció i trets intrínsecs associats a l'exercici (extensió prèvia de l'entrenament, durada de la cursa,...) en els individus. Així mateix, es va trobar que les induccions de GDF15 i d'FGF21 no correlacionaven entre elles.

Fins a l'actualitat, els efectes de l'exercici sobre GDF15 amb prou feines han estat descrits. Dos estudis realitzats en jugadors de futbol després d'un partit i en jugadors de rugbi després d'un entrenament van mostrar un augment significatiu dels nivells de GDF15 en sang (Galliera et al., 2014; Sanchis-Gomar et al., 2013). Per altra banda, en un estudi recent dut a terme amb voluntaris fent un exercici al 67% de la seva VO₂ màxima durant 1h també van observar un augment significatiu dels nivells circulants de GDF15 (Kleinert et al., 2018). Tot i això, en els estudis publicats fins ara l'increment de GDF15 observat es troba entre 1,5 i 2,5 vegades respecte al basal; molt inferior a l'increment observat per nosaltres després d'una marató (exercici intens).

Això mateix també ho observem pel que fa a FGF21; diversos estudis demostren un augment dels nivells d'FGF21 (2-4 vegades respecte al basal) després d'un exercici agut (1-3h) (Hansen et al., 2015, 2016; Kim et al., 2013; Morville et al., 2018; Sargeant et al., 2018; Slusher et al., 2015), també un augment molt inferior al observat en aquest estudi després d'una marató (unes 20 vegades més).

Finalment, en aquesta tesi no és la primera vegada s'observa un increment paral·lel dels factors GDF15 i FGF21; hem observat aquest increment en paral·lel en un context de patologia neuromuscular causada per mutacions en el DNA mitocondrial, les cèl·lules musculars alliberen aquests dos factors en resposta al dany mitocondrial.

Val la pena esmentar que, a més de l'exercici, s'han observat increments paral·lels de GDF15 i FGF21 en circulació en condicions patològiques, com ara en pacients afectats per una patologia neuromuscular causada per mutacions en el DNA mitocondrial i, de fet, els

miotubs secreten activament aquests dos factors en resposta a dany mitocondrial *in vitro* (Montero et al., 2016). No obstant això, fins i tot en aquestes condicions patològiques, la correlació entre GDF15 i FGF21 no sempre és observada i s'ha proposat un valor diferent de GDF15 com a biomarcador de dany muscular en relació a FGF21, estant aquest últim més associat a patologia mitocondrial (Lehtonen et al., 2016).

La manca de correlació entre FGF21 i GDF15 suggereix diferents processos fisiològics (i potser teixit d'origen) implicats en els seus augments a nivell de circulació. Així, tenint en compte que l'increment d'FGF21 en resposta a la cursa està associat a una menor glicèmia i que el fetge és el principal lloc de producció d'FGF21 en condicions fisiològiques, és possible que el fetge sigui la font principal d'FGF21 en resposta a l'exercici. Un altre estudi publicat anteriorment també proposa el fetge com el lloc de producció d'FGF21 en resposta a l'exercici i és consistent amb el comportament d'altres hepatoquines (Weigert et al., 2019).

S'hauria de seguir investigant per poder determinar si aquestes diferències en els nivells de GDF15 i FGF21 en els atletes poden tenir un valor predictiu en relació amb les adaptacions subjacents o amb una resposta potencialment perjudicial a llarg termini associat a un exercici intens, com és una maratón.

GDF15, un nou factor secretable regulador del metabolisme

En aquesta tesi hem pogut estudiar la proteïna GDF15 en situacions molt diverses; patològiques i fisiològiques, sistèmiques i locals i en models humans i de ratolí. GDF15 sembla ser una important proteïna reguladora del metabolisme, amb efectes molt diversos en funció de teixit i condició. Així, regula la termogènesi localment en el teixit adipós marró en situació d'estímul adrenèrgic, està implicada en el desenvolupament pre-natal i post-natal actuant a nivell central i respon a situacions d'estrès tant patològiques (patologia mitocondrial) com fisiològiques (exercici). Tot i això, és necessari seguir investigant per tal d'entendre els mecanismes i la importància biològica de GDF15 en cadascuna d'aquestes situacions.

A més a més, en diverses condicions trobem paral·lelament a l'augment de GDF15 la inducció del factor FGF21. Tot i això, s'ha observat que aquests dos factors, tot i respondre en paral·lel no semblen seguir les mateixes vies de senyalització. Aquest paral·lelisme també s'haurà de seguir estudiant per entendre bé les seves implicacions fisiològiques.

CONCLUSIONS

Part 1: Estudis experimentals en models animals i cel·lulars

1. L'estímul fisiològic del fred, així com la estimulació β 3-adrenèrgica, provoquen una inducció de l'expressió de GDF15 en el teixit adipós marró i el teixit adipós blanc subcutani.
2. Els adipòcits marrons són els responsables de l'expressió i secreció de GDF15 en resposta a estímuls noradrenèrgics, mitjançats per la proteïna cinasa A.
3. Les accions autocrines d'FGF21 estan implicades en la regulació de GDF15 en resposta a estímuls termogènics en els adipòcits marrons.
4. El medi de cultiu d'adipòcits marrons exerceix una acció anti-inflamatòria en els macròfags. Tant mitjançant l'ús d'anticossos com mitjançant reducció específica dels nivells de GDF15 via shRNA es mostra que la presència de GDF15 secretat és clau per a aquesta acció anti-inflamatòria.

En resum, s'ha identificat GDF15 com a una nova adipoquina marró ("batoquina") produïda en resposta a estímuls termogènics en el teixit adipós i amb acció, preferentment paracrina, inhibint l'activitat pro-inflamatòria dels macròfags.

Part 2: Estudis en humans

5. Els nivells de GDF15 i d'FGF21 en pacients pediàtrics amb patologia mitocondrial primària estan anormalment elevats. El bloqueig experimental de l'activitat oxidativa mitocondrial en cèl·lules musculars en cultiu reproduceix un potent efecte d'inducció de l'expressió i secreció de GF15 i FGF21.
6. Els nivells de GDF15 en sang al moment de néixer són més elevats que en la vida adulta, normalitzant-se plenament als 2 anys de vida. Els nadons amb baix pes al néixer mantenen nivells més baixos de GDF15 en etapes primerenques del desenvolupament (4 mesos post-natal).
7. Els nivells de GDF15 i d'FGF21 augmenten dràsticament en resposta a l'exercici intens continuat (corredors de marató) tot i que 2 dies post-exercici són suficients per a normalitzar-ne els valors. El grau d'inducció de GDF15 i d'FGF21 en cada individu no correlacionen entre sí. Els nivells d'aquests factors no es veuen alterats per l'hàbit d'entrenament del individu.

En resum, observem que GDF15 mostra importants canvis en condicions patològiques (patologia mitocondrial) i fisiològiques (desenvolupament post-natal, exercici físic). Cal interpretar aquests canvis com a resposta homeostàtica del organisme a situacions d'estrès i avaluar la vàlua de GDF15 com a biomarcador d'alteracions adaptatives i/o patològiques en l'organisme.

BIBLIOGRAFIA

- Adela, R., and Banerjee, S.K. (2015). GDF-15 as a Target and Biomarker for Diabetes and Cardiovascular Diseases: A Translational Prospective. *J. Diabetes Res.* 2015, 490842.
- Airaksinen, M.S., and Saarma, M. (2002). The GDNF family: Signalling, biological functions and therapeutic value. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 383–394.
- Anand, I.S., Kempf, T., Rector, T.S., Tapken, H., Allhoff, T., Jantzen, F., Kuskowski, M., Cohn, J.N., Drexler, H., and Wollert, K.C. (2010). Serial Measurement of Growth-Differentiation Factor-15 in Heart Failure. *Circulation* 122, 1387–1395.
- Artz, A., Butz, S., and Vestweber, D. (2016). GDF-15 inhibits integrin activation and mouse neutrophil recruitment through the ALK-5/TGF- β RII heterodimer. *Blood* 128, 529–541.
- Babaknejad, N., Nayeri, H., Hemmati, R., Bahrami, S., and Esmailzadeh, A. (2018). An Overview of FGF19 and FGF21: The Therapeutic Role in the Treatment of the Metabolic Disorders and Obesity. *Horm. Metab. Res.* 50, 441–452.
- Baek, S.J., Kim, K.S., Nixon, J.B., Wilson, L.C., and Eling, T.E. (2001). Cyclooxygenase inhibitors regulate the expression of a TGF-beta superfamily member that has proapoptotic and antitumorigenic activities. *Mol. Pharmacol.* 59, 901–908.
- Barbatelli, G., Murano, I., Madsen, L., Hao, Q., Jimenez, M., Kristiansen, K., Giacobino, J.P., De Matteis, R., and Cinti, S. (2010). The emergence of cold-induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation. *Am. J. Physiol. Metab.* 298, E1244–E1253.
- Barker, D.J.P., Hales, C.N., Fall, C.H.D., Smond, C.O., Phipps, K., and Clark, P.M.S. (1993). Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. *Diabetologia.* 36, 62–67.
- Bauskin, A.R., Zhang, H.P., Fairlie, W.D., He, X.Y., Russell, P.K., Moore, A.G., Brown, D.A., Stanley, K.K., and Breit, S.N. (2000). The propeptide of macrophage inhibitory cytokine (MIC-1), a TGF-beta superfamily member, acts as a quality control determinant for correctly folded MIC-1. *EMBO J.* 19, 2212–2220.
- Bauskin, A.R., Jiang, L., Luo, X.W., Wu, L., Brown, D.A., and Breit, S.N. (2010). The TGF- β Superfamily Cytokine MIC-1/GDF15: Secretory Mechanisms Facilitate Creation of Latent Stromal Stores. *J. Interf. Cytokine Res.* 30, 389–397.
- Bays, H.E. (2011). Adiposopathy: Is “Sick Fat” a Cardiovascular Disease? *J. Am. Coll. Cardiol.* 57, 2461–2473.
- Berglund, E.D., Li, C.Y., Bina, H.A., Lynes, S.E., Michael, M.D., Shanafelt, A.B., Kharitonov, A., and Wasserman, D.H. (2009). Fibroblast Growth Factor 21 Controls Glycemia via Regulation of Hepatic Glucose Flux and Insulin Sensitivity. *Endocrinology* 150, 4084–4093.
- Bird, S.R., Linden, M., and Hawley, J.A. (2014). Acute changes to biomarkers as a consequence of prolonged strenuous running. *Ann. Clin. Biochem.* 51, 137–150.

- Bloch, S., Lee, J., Wort, S., Polkey, M., Kemp, P., and Griffiths, M. (2012). S73 Circulating Regulators of Acute Muscle Wasting in the Critically Ill: GDF-15 a Potential Novel Driver of Acute Muscle Wasting. *Thorax* 67, A37.1-A37.
- Bonaca, M.P., Morrow, D.A., Braunwald, E., Cannon, C.P., Jiang, S., Breher, S., Sabatine, M.S., Kempf, T., Wallentin, L., and Wollert, K.C. (2011). Growth Differentiation Factor-15 and Risk of Recurrent Events in Patients Stabilized After Acute Coronary Syndrome. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31, 203–210.
- BonDurant, L.D., and Potthoff, M.J. (2018). Fibroblast Growth Factor 21: A Versatile Regulator of Metabolic Homeostasis. *Annu. Rev. Nutr.* 38, 173–196.
- Bootcov, M.R., Bauskin, A.R., Valenzuela, S.M., Moore, A.G., Bansal, M., He, X.Y., Zhang, H.P., Donnellan, M., Mahler, S., Pryor, K., et al. (1997). MIC-1, a novel macrophage inhibitory cytokine, is a divergent member of the TGF-beta superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 11514–11519.
- Bordicchia, M., Liu, D., Amri, E.-Z., Ailhaud, G., Dessì-Fulgheri, P., Zhang, C., Takahashi, N., Sarzani, R., and Collins, S. (2012). Cardiac natriuretic peptides act via p38 MAPK to induce the brown fat thermogenic program in mouse and human adipocytes. *J. Clin. Invest.* 122, 1022–1036.
- Boström, P., Wu, J., Jedrychowski, M.P., Korde, A., Ye, L., Lo, J.C., Rasbach, K.A., Boström, E.A., Choi, J.H., Long, J.Z., et al. (2012). A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature* 481, 463–468.
- Böttner, M., Laaff, M., Schechinger, B., Rappold, G., Unsicker, K., and Suter-Crazzolara, C. (1999). Characterization of the rat, mouse, and human genes of growth/differentiation factor-15/macrophage inhibiting cytokine-1 (GDF-15/MIC-1). *Gene* 237, 105–111.
- Bourová, L., Pesanová, Z., Novotný, J., Bengtsson, T., and Svoboda, P. (2000). Differentiation of cultured brown adipocytes is associated with a selective increase in the short variant of g(s)alpha protein. Evidence for higher functional activity of g(s)alphaS. *Mol. Cell. Endocrinol.* 167, 23–31.
- Brennan, J., Norris, D.P., and Robertson, E.J. (2002). Nodal activity in the node governs left-right asymmetry. *Genes Dev.* 16, 2339–2344.
- Bronnikov, G., Bengtsson, T., Kramarova, L., Golozoubova, V., Cannon, B., and Nedergaard, J. (1999). β_1 to β_3 Switch in Control of Cyclic Adenosine Monophosphate during Brown Adipocyte Development Explains Distinct β -Adrenoceptor Subtype Mediation of Proliferation and Differentiation. *Endocrinology* 140, 4185–4197.
- Brown, D.A., Breit, S.N., Buring, J., Fairlie, W.D., Bauskin, A.R., Liu, T., and Ridker, P.M. (2002). Concentration in plasma of macrophage inhibitory cytokine-1 and risk of cardiovascular events in women: a nested case-control study. *Lancet (London, England)* 359, 2159–2163.
- Burýšek, L., and Houšťek, J. (1997). β -Adrenergic stimulation of interleukin-1 α and interleukin-6 expression in mouse brown adipocytes. *FEBS Lett.* 411, 83–86.

- Cameron, I.L., and Smith, R.E. (1964). Cytological responses of brown fat tissue in cold-exposed rats. *J. Cell Biol.* *23*, 89–100.
- Cannon, B., and Nedergaard, J. (2004). Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. *Physiol. Rev.* *84*, 277–359.
- Cannon, B., and Nedergaard, J. (2011). Nonshivering thermogenesis and its adequate measurement in metabolic studies. *J. Exp. Biol.* *214*, 242–253.
- Cao, W., Medvedev, A. V, Daniel, K.W., and Collins, S. (2001). beta-Adrenergic activation of p38 MAP kinase in adipocytes: cAMP induction of the uncoupling protein 1 (UCP1) gene requires p38 MAP kinase. *J. Biol. Chem.* *276*, 27077–27082.
- Cawthorn, W.P., Scheller, E.L., and MacDougald, O.A. (2012). Adipose tissue stem cells meet preadipocyte commitment: going back to the future. *J. Lipid Res.* *53*, 227–246.
- Cereijo, R., Gavaldà-Navarro, A., Cairó, M., Quesada-López, T., Villarroya, J., Morón-Ros, S., Sánchez-Infantes, D., Peyrou, M., Iglesias, R., Mampel, T., et al. (2018). CXCL14, a Brown Adipokine that Mediates Brown-Fat-to-Macrophage Communication in Thermogenic Adaptation. *Cell Metab.* *28*, 750–763.
- Chartoumpekis, D. V, Habeos, I.G., Ziros, P.G., Psyrogiannis, A.I., Kyriazopoulou, V.E., and Papavassiliou, A.G. (2011). Brown adipose tissue responds to cold and adrenergic stimulation by induction of FGF21. *Mol. Med.* *17*, 736–740.
- Chawla, A., Nguyen, K.D., and Goh, Y.P.S. (2011). Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. *Nat. Rev. Immunol.* *11*, 738–749.
- Chinnery, P.F. (2015). Mitochondrial disease in adults: what's old and what's new? *EMBO Mol. Med.* *7*, 1503–1512.
- Chrysovergis, K., Wang, X., Kosak, J., Lee, S.-H., Sik Kim, J., Foley, J.F., Travlos, G., Singh, S., Joon Baek, S., and Eling, T.E. (2014). NAG-1/GDF15 prevents obesity by increasing thermogenesis, lipolysis and oxidative metabolism. *Int. J. Obes.* *38*, 1555–1564.
- Chung, H.K., Ryu, D., Kim, K.S., Chang, J.Y., Kim, Y.K., Yi, H.-S., Kang, S.G., Choi, M.J., Lee, S.E., Jung, S.-B., et al. (2017a). Growth differentiation factor 15 is a myomitokine governing systemic energy homeostasis. *J. Cell Biol.* *216*, 149–165.
- Chung, K.-J., Chatzigeorgiou, A., Economopoulou, M., Garcia-Martin, R., Alexaki, V.I., Mitroulis, I., Nati, M., Gebler, J., Ziemssen, T., Goelz, S.E., et al. (2017b). A self-sustained loop of inflammation-driven inhibition of beige adipogenesis in obesity. *Nat. Immunol.* *18*, 654–664.
- Cimino, I., Coll, A.P., and Yeo, G.S.H. (2017). GDF15 and energy balance: homing in on a mechanism. *Nat. Med.* *23*, 1119.
- Cinti, S. (2000). Anatomy of the adipose organ. *Eat. Weight Disord. - Stud. Anorexia, Bulim. Obes.* *5*, 132–142.

- Clayton, P.E., Cianfarani, S., Czernichow, P., Johannsson, G., Rapaport, R., and Rogol, A. (2007). Management of the Child Born Small for Gestational Age through to Adulthood: A Consensus Statement of the International Societies of Pediatric Endocrinology and the Growth Hormone Research Society. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *92*, 804–810.
- Corre, J., Hébraud, B., and Bourin, P. (2013). Concise review: growth differentiation factor 15 in pathology: a clinical role? *Stem Cells Transl. Med.* *2*, 946–952.
- Cristancho, A.G., and Lazar, M.A. (2011). Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *12*, 722–734.
- Cypess, A.M., Lehman, S., Williams, G., Tal, I., Rodman, D., Goldfine, A.B., Kuo, F.C., Palmer, E.L., Tseng, Y.-H., Doria, A., et al. (2009). Identification and Importance of Brown Adipose Tissue in Adult Humans. *N. Engl. J. Med.* *360*, 1509–1517.
- Díaz, M., García, C., Sebastiani, G., de Zegher, F., López-Bermejo, A., and Ibáñez, L. (2017). Placental and Cord Blood Methylation of Genes Involved in Energy Homeostasis: Association With Fetal Growth and Neonatal Body Composition. *Diabetes* *66*, 779–784.
- Díaz, M., García-Beltran, C., López-Bermejo, A., de Zegher, F., and Ibáñez, L. (2018). GLP-1 and IGF-I levels are elevated in late infancy in low birth weight infants, independently of GLP-1 receptor polymorphisms and neonatal nutrition. *Int. J. Obes.* *42*, 915–918.
- Ding, Q., Mracek, T., Gonzalez-Muniesa, P., Kos, K., Wilding, J., Trayhurn, P., and Bing, C. (2009). Identification of macrophage inhibitory cytokine-1 in adipose tissue and its secretion as an adipokine by human adipocytes. *Endocrinology* *150*, 1688–1696.
- Dinh, W., Füh, R., Lankisch, M., Hess, G., Zdunek, D., Scheffold, T., Kramer, F., Klein, R.M., Barroso, M.C., and Nickl, W. (2011). Growth-differentiation factor-15: a novel biomarker in patients with diastolic dysfunction? *Arq. Bras. Cardiol.* *97*, 65–75.
- Dominguez-Rodriguez, A., Abreu-Gonzalez, P., and Avanzas, P. (2011). Relation of Growth-Differentiation Factor 15 to Left Ventricular Remodeling in ST-Segment Elevation Myocardial Infarction. *Am. J. Cardiol.* *108*, 955–958.
- Dowal, L., Parameswaran, P., Phat, S., Akella, S., Majumdar, I.D., Ranjan, J., Shah, C., Mogre, S., Guntur, K., Thapa, K., et al. (2017). Intrinsic Properties of Brown and White Adipocytes Have Differential Effects on Macrophage Inflammatory Responses. *Mediators Inflamm.* *2017*, 9067049.
- Emmerson, P.J., Wang, F., Du, Y., Liu, Q., Pickard, R.T., Gonciarz, M.D., Coskun, T., Hamang, M.J., Sindelar, D.K., Ballman, K.K., et al. (2017). The metabolic effects of GDF15 are mediated by the orphan receptor GFRAL. *Nat. Med.* *23*, 1215–1219.
- Fan, L.Y., Jin, Z.G., Zong, M., Wang, Q.Z., Ju, Y., Sun, L.S., Gu, Y.Y., Yu, P., Zhang, D.F., and Liu, Z.M. (2014). Growth differentiation factor 15, ischemia modified albumin and pregnancy-associated plasma protein A in patients with coronary artery disease. *Clin. Lab.* *60*, 973–982.

Fearon, K., Strasser, F., Anker, S.D., Bosaeus, I., Bruera, E., Fainsinger, R.L., Jatoi, A., Loprinzi, C., MacDonald, N., Mantovani, G., et al. (2011). Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus. *Lancet Oncol.* 12, 489–495.

Fejzo, M.S., Sazonova, O. V., Sathirapongsasuti, J.F., Hallgrímsdóttir, I.B., Vacic, V., MacGibbon, K.W., Schoenberg, F.P., Mancuso, N., Slamon, D.J., and Mullin, P.M. (2018). Placenta and appetite genes GDF15 and IGFBP7 are associated with hyperemesis gravidarum. *Nat. Commun.* 9, 1178.

Feldmann, H.M., Golozoubova, V., Cannon, B., and Nedergaard, J. (2009). UCP1 ablation induces obesity and abolishes diet-induced thermogenesis in mice exempt from thermal stress by living at thermoneutrality. *Cell Metab.* 9, 203–209.

Fischer, K., Ruiz, H.H., Jhun, K., Finan, B., Oberlin, D.J., van der Heide, V., Kalinovich, A. V., Petrovic, N., Wolf, Y., Clemmensen, C., et al. (2017). Alternatively activated macrophages do not synthesize catecholamines or contribute to adipose tissue adaptive thermogenesis. *Nat. Med.* 23, 623–630.

Fisher, F.M., Kleiner, S., Douris, N., Fox, E.C., Mepani, R.J., Verdeguer, F., Wu, J., Kharitonov, A., Flier, J.S., Maratos-Flier, E., et al. (2012). FGF21 regulates PGC-1 α and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. *Genes Dev.* 26, 271–281.

Fon Tacer, K., Bookout, A.L., Ding, X., Kurosu, H., John, G.B., Wang, L., Goetz, R., Mohammadi, M., Kuro-o, M., Mangelsdorf, D.J., et al. (2010). Research Resource: Comprehensive Expression Atlas of the Fibroblast Growth Factor System in Adult Mouse. *Mol. Endocrinol.* 24, 2050–2064.

Frayn, K.N., Karpe, F., Fielding, B.A., Macdonald, I.A., and Coppack, S.W. (2003). Integrative physiology of human adipose tissue. *Int. J. Obes.* 27, 875–888.

Fujita, Y., Ito, M., Kojima, T., Yatsuga, S., Koga, Y., and Tanaka, M. (2015). GDF15 is a novel biomarker to evaluate efficacy of pyruvate therapy for mitochondrial diseases. *Mitochondrion* 20, 34–42.

Galliera, E., Lombardi, G., Marazzi, M.G., Grasso, D., Vianello, E., Pozzoni, R., Banfi, G., and Corsi Romanelli, M.M. (2014). Acute exercise in elite rugby players increases the circulating level of the cardiovascular biomarker GDF-15. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 74, 492–499.

Ge, X., Chen, C., Hui, X., Wang, Y., Lam, K.S.L., and Xu, A. (2011). Fibroblast Growth Factor 21 Induces Glucose Transporter-1 Expression through Activation of the Serum Response Factor/Ets-Like Protein-1 in Adipocytes. *J. Biol. Chem.* 286, 34533–34541.

Gessner, K. (1551). *Conradi Gesneri medici Tigurine Historiae Animalium Lib. I de Quadripedibus viviparis.*

Gesta, S., Tseng, Y.-H., and Kahn, C.R. (2007). Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell* 131, 242–256.

- Giordano, A., Smorlesi, A., Frontini, A., Barbatelli, G., and Cinti, S. (2014). Mechanisms in endocrinology: White, brown and pink adipocytes: the extraordinary plasticity of the adipose organ. *Eur. J. Endocrinol.* *170*, R159–R171.
- Giralt, M., and Villarroya, F. (2013). White, Brown, Beige/Brite: Different Adipose Cells for Different Functions? *Endocrinology* *154*, 2992–3000.
- Goetz, R., and Mohammadi, M. (2013). Exploring mechanisms of FGF signalling through the lens of structural biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *14*, 166–180.
- Golozoubova, V., Hohtola, E., Matthias, A., Jacobsson, A., Cannon, B., and Nedergaard, J. (2001). Only UCP1 can mediate adaptive nonshivering thermogenesis in the cold. *FASEB J.* *15*, 2048–2050.
- Gorman, G.S., Chinnery, P.F., DiMauro, S., Hirano, M., Koga, Y., McFarland, R., Suomalainen, A., Thorburn, D.R., Zeviani, M., and Turnbull, D.M. (2016). Mitochondrial diseases. *Nat. Rev. Dis. Primers.* *20*, 16080.
- Guerra, C., Roncero, C., Porras, A., Fernández, M., and Benito, M. (1996). Triiodothyronine induces the transcription of the uncoupling protein gene and stabilizes its mRNA in fetal rat brown adipocyte primary cultures. *J. Biol. Chem.* *271*, 2076–2081.
- Gupta, R.K., Arany, Z., Seale, P., Mepani, R.J., Ye, L., Conroe, H.M., Roby, Y.A., Kulaga, H., Reed, R.R., and Spiegelman, B.M. (2010). Transcriptional control of preadipocyte determination by Zfp423. *Nature* *464*, 619–623.
- Haman, F. (2006). HIGHLIGHTED TOPIC A Physiological Systems Approach to Human and Mammalian Thermoregulation Shivering in the cold: from mechanisms of fuel selection to survival. *J Appl Physiol* *100*, 1702–1708.
- Hanatani, S., Izumiya, Y., Takashio, S., Kojima, S., Yamamuro, M., Araki, S., Rokutanda, T., Tsujita, K., Yamamoto, E., Tanaka, T., et al. (2014). Growth differentiation factor 15 can distinguish between hypertrophic cardiomyopathy and hypertensive hearts. *Heart Vessels* *29*, 231–237.
- Hansen, J.S., Clemmesen, J.O., Secher, N.H., Hoene, M., Drescher, A., Weigert, C., Pedersen, B.K., and Plomgaard, P. (2015). Glucagon-to-insulin ratio is pivotal for splanchnic regulation of FGF-21 in humans. *Mol. Metab.* *4*, 551.
- Hansen, J.S., Pedersen, B.K., Xu, G., Lehmann, R., Weigert, C., and Plomgaard, P. (2016). Exercise-Induced Secretion of FGF21 and Follistatin Are Blocked by Pancreatic Clamp and Impaired in Type 2 Diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *101*, 2816–2825.
- Harms, M., and Seale, P. (2013). Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat. Med.* *19*, 1252–1263.
- Harms, M.J., Ishibashi, J., Wang, W., Lim, H.-W., Goyama, S., Sato, T., Kurokawa, M., Won, K.-J., and Seale, P. (2014). Prdm16 is required for the maintenance of brown adipocyte identity and function in adult mice. *Cell Metab.* *19*, 593–604.

- Hätinen, T., Holm, L., and Airaksinen, M.S. (2007). Loss of neurturin in frog--comparative genomics study of GDNF family ligand-receptor pairs. *Mol. Cell. Neurosci.* *34*, 155–167.
- Hedger, M.P., Winnall, W.R., Phillips, D.J., and de Kretser, D.M. (2011). The Regulation and Functions of Activin and Follistatin in Inflammation and Immunity. In *Vitamins and Hormones*. *84*, 255–297.
- Hinck, A.P., Mueller, T.D., and Springer, T.A. (2016). Structural Biology and Evolution of the TGF- β Family. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *8*, a022103.
- Hokken-Koelega, A.C.S., De Ridder, M.A.J., Lemmen, R.J., Hartog, H. Den, De Muinck Keizer-Schrama, S.M.P.F., and Drop, S.L.S. (1995). Children Born Small for Gestational Age: Do They Catch Up? *Pediatr. Res.* *38*, 267–271.
- Hondares, E., Iglesias, R., Giralt, A., Gonzalez, F.J., Giralt, M., Mampel, T., and Villarroya, F. (2011). Thermogenic activation induces FGF21 expression and release in brown adipose tissue. *J. Biol. Chem.* *286*, 12983–12990.
- Hromas, R., Hufford, M., Sutton, J., Xu, D., Li, Y., and Lu, L. (1997). PLAB, a novel placental bone morphogenetic protein. *Biochim. Biophys. Acta* *1354*, 40–44.
- Hsu, J.-Y., Crawley, S., Chen, M., Ayupova, D.A., Lindhout, D.A., Higbee, J., Kutach, A., Joo, W., Gao, Z., Fu, D., et al. (2017). Non-homeostatic body weight regulation through a brainstem-restricted receptor for GDF15. *Nature* *550*, 255–259.
- Iizuka, K., Takeda, J., and Horikawa, Y. (2009). Glucose induces FGF21 mRNA expression through ChREBP activation in rat hepatocytes. *FEBS Lett.* *583*, 2882–2886.
- Ishibashi, J., and Seale, P. (2010). Medicine. Beige can be slimming. *Science* *328*, 1113–1114.
- Itoh, N., and Ornitz, D.M. (2011). Fibroblast growth factors: from molecular evolution to roles in development, metabolism and disease. *J. Biochem.* *149*, 121–130.
- Izumiya, Y., Bina, H.A., Ouchi, N., Akasaki, Y., Kharitonov, A., and Walsh, K. (2008). FGF21 is an Akt-regulated myokine. *FEBS Lett.* *582*, 3805–3810.
- Johnen, H., Lin, S., Kuffner, T., Brown, D.A., Tsai, V.W.-W., Bauskin, A.R., Wu, L., Pankhurst, G., Jiang, L., Junankar, S., et al. (2007). Tumor-induced anorexia and weight loss are mediated by the TGF- β superfamily cytokine MIC-1. *Nat. Med.* *13*, 1333–1340.
- Jung, S.-B., Choi, M.J., Ryu, D., Yi, H.-S., Lee, S.E., Chang, J.Y., Chung, H.K., Kim, Y.K., Kang, S.G., Lee, J.H., et al. (2018). Reduced oxidative capacity in macrophages results in systemic insulin resistance. *Nat. Commun.* *9*, 1551.
- Kaitu'u-Lino, T.J., Bambang, K., Onwude, J., Hiscock, R., Konje, J., and Tong, S. (2013). Plasma MIC-1 and PAPP-A Levels Are Decreased among Women Presenting to an Early Pregnancy Assessment Unit, Have Fetal Viability Confirmed but Later Miscarry. *PLoS One* *8*, e72437.

- Kajimura, S., and Saito, M. (2014). A New Era in Brown Adipose Tissue Biology: Molecular Control of Brown Fat Development and Energy Homeostasis. *Annu. Rev. Physiol.* *76*, 225–249.
- Kajimura, S., Seale, P., Kubota, K., Lunsford, E., Frangioni, J. V., Gygi, S.P., and Spiegelman, B.M. (2009). Initiation of myoblast to brown fat switch by a PRDM16–C/EBP- β transcriptional complex. *Nature* *460*, 1154–1158.
- Kalko, S.G., Paco, S., Jou, C., Rodríguez, M.A., Meznaric, M., Rogac, M., Jekovec-Vrhovsek, M., Sciacco, M., Moggio, M., Fagiolari, G., et al. (2014). Transcriptomic profiling of TK2 deficient human skeletal muscle suggests a role for the p53 signalling pathway and identifies growth and differentiation factor-15 as a potential novel biomarker for mitochondrial myopathies. *BMC Genomics* *15*, 91.
- Khan, S.Q., Ng, K., Dhillon, O., Kelly, D., Quinn, P., Squire, I.B., Davies, J.E., and Ng, L.L. (2009). Growth differentiation factor-15 as a prognostic marker in patients with acute myocardial infarction. *Eur. Heart J.* *30*, 1057–1065.
- Kharitononkov, A., Dunbar, J.D., Bina, H.A., Bright, S., Moyers, J.S., Zhang, C., Ding, L., Micanovic, R., Mehrbod, S.F., Knierman, M.D., et al. (2008). FGF-21/FGF-21 receptor interaction and activation is determined by β Klotho. *J. Cell. Physiol.* *215*, 1–7.
- Kilkenny, D.M., and Rocheleau, J. V (2016). The FGF21 Receptor Signaling Complex: Klotho β , FGFR1c, and Other Regulatory Interactions. *Vitam. Horm.* *101*, 17–58.
- Kim, K.H., Kim, S.H., Min, Y.-K., Yang, H.-M., Lee, J.-B., and Lee, M.-S. (2013). Acute Exercise Induces FGF21 Expression in Mice and in Healthy Humans. *PLoS One* *8*, e63517.
- Kim, K.H., Kim, S.H., Han, D.H., Jo, Y.S., Lee, Y.-H., and Lee, M.-S. (2018). Growth differentiation factor 15 ameliorates nonalcoholic steatohepatitis and related metabolic disorders in mice. *Sci. Rep.* *8*, 6789.
- Kim, S.H., Kim, K.H., Kim, H.-K., Kim, M.-J., Back, S.H., Konishi, M., Itoh, N., and Lee, M.-S. (2015). Fibroblast growth factor 21 participates in adaptation to endoplasmic reticulum stress and attenuates obesity-induced hepatic metabolic stress. *Diabetologia* *58*, 809–818.
- Kleinert, M., Clemmensen, C., Sjøberg, K.A., Carl, C.S., Jeppesen, J.F., Wojtaszewski, J.F.P., Kiens, B., and Richter, E.A. (2018). Exercise increases circulating GDF15 in humans. *Mol. Metab.* *9*, 187–191.
- Kobayashi, Y., Takeuchi, T., Hosoi, T., Yoshizaki, H., and Loeppky, J.A. (2005). Effect of a Marathon Run on Serum Lipoproteins, Creatine Kinase, and Lactate Dehydrogenase in Recreational Runners. *Res. Q. Exerc. Sport* *76*, 450–455.
- Koopmann, J., Buckhaults, P., Brown, D.A., Zahurak, M.L., Sato, N., Fukushima, N., Sokoll, L.J., Chan, D.W., Yeo, C.J., Hruban, R.H., et al. (2004). Serum macrophage inhibitory cytokine 1 as a marker of pancreatic and other periampullary cancers. *Clin. Cancer Res.* *10*, 2386–2392.

- Kratz, A., Lewandrowski, K.B., Siegel, A.J., Chun, K.Y., Flood, J.G., Van Cott, E.M., and Lee-Lewandrowski, E. (2002). Effect of Marathon Running on Hematologic and Biochemical Laboratory Parameters, Including Cardiac Markers. *Am. J. Clin. Pathol.* 118, 856–863.
- Krauss, S., Zhang, C.-Y., and Lowell, B.B. (2005). The mitochondrial uncoupling-protein homologues. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 248–261.
- Kuo, M.M.-C., Kim, S., Tseng, C.-Y., Jeon, Y.-H., Choe, S., and Lee, D.K. (2014). BMP-9 as a potent brown adipogenic inducer with anti-obesity capacity. *Biomaterials* 35, 3172–3179.
- Lawton, L.N., Bonaldo, M. de F., Jelenc, P.C., Qiu, L., Baumes, S.A., Marcelino, R.A., de Jesus, G.M., Wellington, S., Knowles, J.A., Warburton, D., et al. (1997). Identification of a novel member of the TGF-beta superfamily highly expressed in human placenta. *Gene* 203, 17–26.
- Lee, S.E., Kang, S.G., Choi, M.J., Jung, S.-B., Ryu, M.J., Chung, H.K., Chang, J.Y., Kim, Y.K., Lee, J.H., Kim, K.S., et al. (2017). Growth Differentiation Factor 15 Mediates Systemic Glucose Regulatory Action of T-Helper Type 2 Cytokines. *Diabetes* 66, 2774–2788.
- Lehtonen, J.M., Forsström, S., Bottani, E., Viscomi, C., Baris, O.R., Isoniemi, H., Höckerstedt, K., Österlund, P., Hurme, M., Jylhävä, J., et al. (2016). FGF21 is a biomarker for mitochondrial translation and mtDNA maintenance disorders. *Neurology* 87, 2290–2299.
- Lerner, L., Gyuris, J., Nicoletti, R., Gifford, J., Krieger, B., and Jatoi, A. (2016). Growth differentiating factor-15 (GDF-15): A potential biomarker and therapeutic target for cancer-associated weight loss. *Oncol. Lett.* 12, 4219–4223.
- Leunissen, R.W.J., Kerkhof, G.F., Stijnen, T., and Hokken-Koelega, A. (2009). Timing and Tempo of First-Year Rapid Growth in Relation to Cardiovascular and Metabolic Risk Profile in Early Adulthood. *JAMA* 301, 2234.
- Li, D., Zhang, H., and Zhong, Y. (2018a). Hepatic GDF15 is regulated by CHOP of the unfolded protein response and alleviates NAFLD progression in obese mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 498, 388–394.
- Li, G., Li, Y., Tan, X., Jia, P., Zhao, J., Liu, D., Wang, T., and Liu, B. (2017). Plasma Growth Differentiation Factor-15 is a Potential Biomarker for Pediatric Pulmonary Arterial Hypertension Associated with Congenital Heart Disease. *Pediatr. Cardiol.* 38, 1620–1626.
- Li, Q., Wu, Y., and Kang, N. (2018b). Marrow Adipose Tissue: Its Origin, Function, and Regulation in Bone Remodeling and Regeneration. *Stem Cells Int.* 31, 7098456.
- Li, Z., Wang, B., Wu, X., Cheng, S.-Y., Paraoan, L., and Zhou, J. (2005). Identification, expression and functional characterization of the GRAL gene. *J. Neurochem.* 95, 361–376.
- Lim, J.H., Park, J.-W., Min, D.S., Chang, J.-S., Lee, Y.H., Park, Y.B., Choi, K.S., and Kwon, T.K. (2007). NAG-1 up-regulation mediated by EGR-1 and p53 is critical for quercetin-induced apoptosis in HCT116 colon carcinoma cells. *Apoptosis* 12, 411–421.

- Lin, J.-F., Wu, S., Hsu, S.-Y., Yeh, K.-H., Chou, H.-H., Cheng, S.-T., Wu, T.-Y., Hsu, W.-T., Yang, C.-C., and Ko, Y.-L. (2014). Growth-differentiation factor-15 and major cardiac events. *Am. J. Med. Sci.* *347*, 305–311.
- Lin, Z., Tian, H., Lam, K.S.L., Lin, S., Hoo, R.C.L., Konishi, M., Itoh, N., Wang, Y., Bornstein, S.R., Xu, A., et al. (2013). Adiponectin Mediates the Metabolic Effects of FGF21 on Glucose Homeostasis and Insulin Sensitivity in Mice. *Cell Metab.* *17*, 779–789.
- Ling, N., Ying, S.-Y., Ueno, N., Shimasaki, S., Esch, F., Hotta, M., and Guillemin, R. (1986). Pituitary FSH is released by a heterodimer of the β -subunits from the two forms of inhibin. *Nature* *321*, 779–782.
- Long, J.Z., Svensson, K.J., Tsai, L., Zeng, X., Roh, H.C., Kong, X., Rao, R.R., Lou, J., Lokurkar, I., Baur, W., et al. (2014). A Smooth Muscle-Like Origin for Beige Adipocytes. *Cell Metab.* *19*, 810–820.
- López, M., Varela, L., Vázquez, M.J., Rodríguez-Cuenca, S., González, C.R., Velagapudi, V.R., Morgan, D.A., Schoenmakers, E., Agassandian, K., Lage, R., et al. (2010). Hypothalamic AMPK and fatty acid metabolism mediate thyroid regulation of energy balance. *Nat. Med.* *16*, 1001–1008.
- Ludwig, R.G., Rocha, A.L., and Mori, M.A. (2018). Circulating molecules that control brown/beige adipocyte differentiation and thermogenic capacity. *Cell Biol. Int.* *42*, 701–710.
- Luo, L., and Liu, M. (2016). Adipose tissue in control of metabolism. *J. Endocrinol.* *231*, R77–R99.
- Macia, L., Tsai, V.W.-W.W., Nguyen, A.D., Johnen, H., Kuffner, T., Shi, Y.-C.C., Lin, S., Herzog, H., Brown, D.A., Breit, S.N., et al. (2012). Macrophage inhibitory cytokine 1 (MIC-1/GDF15) decreases food intake, body weight and improves glucose tolerance in mice on normal & obesogenic diets. *PLoS One* *7*, 1–8.
- Maddaluno, L., Urwyler, C., and Werner, S. (2017). Fibroblast growth factors: key players in regeneration and tissue repair. *Development* *144*, 4047–4060.
- van Marken Lichtenbelt, W.D., Vanhomerig, J.W., Smulders, N.M., Drossaerts, J.M.A.F.L., Kemerink, G.J., Bouvy, N.D., Schrauwen, P., and Teule, G.J.J. (2009). Cold-Activated Brown Adipose Tissue in Healthy Men. *N. Engl. J. Med.* *360*, 1500–1508.
- Massagué, J. (1998). Tgf- β signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* *67*, 753–791.
- McDonald, M.E., Li, C., Bian, H., Smith, B.D., Layne, M.D., and Farmer, S.R. (2015). Myocardin-Related Transcription Factor A Regulates Conversion of Progenitors to Beige Adipocytes. *Cell* *160*, 105–118.
- Min, K.-W., Liggett, J., Silva, G., Wu, W., Wang, R., Shen, R.-F., Eling, T., and Baek, S. (2015). NAG-1/GDF15 accumulates in the nucleus and modulates transcriptional regulation of the Smad pathway. *Oncogene* *1–12*.

- Montero, R., Yubero, D., Villarroya, J., Henares, D., Jou, C., Rodríguez, M.A., Ramos, F., Nascimento, A., Ortez, C.I., Campistol, J., et al. (2016). GDF-15 Is Elevated in Children with Mitochondrial Diseases and Is Induced by Mitochondrial Dysfunction. *PLoS One* *11*, e0148709.
- Moore, A.G., Brown, D.A., Fairlie, W.D., Bauskin, A.R., Brown, P.K., Munier, M.L.C., Russell, P.K., Salamonsen, L.A., Wallace, E.M., and Breit, S.N. (2000). The Transforming Growth Factor- β Superfamily Cytokine Macrophage Inhibitory Cytokine-1 Is Present in High Concentrations in the Serum of Pregnant Women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *85*, 4781–4788.
- Morikawa, M., Derynck, R., and Miyazono, K. (2016). TGF- β and the TGF- β Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *8*, a021873.
- Morrison, S.F., Madden, C.J., and Tupone, D. (2014). Central Neural Regulation of Brown Adipose Tissue Thermogenesis and Energy Expenditure. *Cell Metab.* *19*, 741–756.
- Morrioni, M., Giordano, A., Zingaretti, M.C., Boiani, R., De Matteis, R., Kahn, B.B., Nisoli, E., Tonello, C., Pisoschi, C., Luchetti, M.M., et al. (2004). Reversible transdifferentiation of secretory epithelial cells into adipocytes in the mammary gland. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *101*, 16801–16806.
- Morville, T., Sahl, R.E., Trammell, S.A.J., Svenningsen, J.S., Gillum, M.P., Helge, J.W., and Clemmensen, C. (2018). Divergent effects of resistance and endurance exercise on plasma bile acids, FGF19, and FGF21 in humans. *JCI Insight* *3*.
- Mueller, T.D., and Nickel, J. (2012). Promiscuity and specificity in BMP receptor activation. *FEBS Lett.* *586*, 1846–1859.
- Mueller, T., Gegenhuber, A., Poelz, W., Haltmayer, M., Steuer, S., Bassetti, S., Stelzig, C., Wolf, C., Winkler, K., Haaf, P., et al. (2004). Preliminary evaluation of the AxSYM B-type natriuretic peptide (BNP) assay and comparison with the ADVIA Centaur BNP assay. *Clin. Chem.* *50*, 1104–1106.
- Muise, E.S., Azzolina, B., Kuo, D.W., El-Sherbeini, M., Tan, Y., Yuan, X., Mu, J., Thompson, J.R., Berger, J.P., and Wong, K.K. (2008). Adipose Fibroblast Growth Factor 21 Is Up-Regulated by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α and Altered Metabolic States. *Mol. Pharmacol.* *74*, 403–412.
- Mullican, S.E., and Rangwala, S.M. (2018). Uniting GDF15 and GFRAL: Therapeutic Opportunities in Obesity and Beyond. *Trends Endocrinol. Metab.* *29*, 560-570.
- Mullican, S.E., Lin-Schmidt, X., Chin, C.-N., Chavez, J.A., Furman, J.L., Armstrong, A.A., Beck, S.C., South, V.J., Dinh, T.Q., Cash-Mason, T.D., et al. (2017). GFRAL is the receptor for GDF15 and the ligand promotes weight loss in mice and nonhuman primates. *Nat. Med.* *23*, 1150–1157.

- Muramatsu, M., Kaibuchi, K., and Arai, K. (1989). A protein kinase C cDNA without the regulatory domain is active after transfection in vivo in the absence of phorbol ester. *Mol. Cell. Biol.* *9*, 831–836.
- Nedergaard, J., and Cannon, B. (2014). The browning of white adipose tissue: some burning issues. *Cell Metab.* *20*, 396–407.
- Nedergaard, J., Golozoubova, V., Matthias, A., Asadi, A., Jacobsson, A., and Cannon, B. (2001). UCP1: the only protein able to mediate adaptive non-shivering thermogenesis and metabolic inefficiency. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* *1504*, 82–106.
- Nguyen, K.D., Qiu, Y., Cui, X., Goh, Y.P.S., Mwangi, J., David, T., Mukundan, L., Brombacher, F., Locksley, R.M., and Chawla, A. (2011). Alternatively activated macrophages produce catecholamines to sustain adaptive thermogenesis. *Nature* *480*, 104–108.
- Nicholls, D.G., and Locke, R.M. (1984). Thermogenic mechanisms in brown fat. *Physiol. Rev.* *64*, 1–64.
- Nicholls, D.G., Bernson, V.S., and Heaton, G.M. (1978). The identification of the component in the inner membrane of brown adipose tissue mitochondria responsible for regulating energy dissipation. *Experientia. Suppl.* *32*, 89–93.
- Nishimura, T., Nakatake, Y., Konishi, M., and Itoh, N. (2000). Identification of a novel FGF, FGF-21, preferentially expressed in the liver. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.* *1492*, 203–206.
- Ornitz, D.M., and Itoh, N. (2015). The Fibroblast Growth Factor signaling pathway. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* *4*, 215–266.
- Osada, M., Park, H.L., Park, M.J., Liu, J.-W., Wu, G., Trink, B., and Sidransky, D. (2007). A p53-type response element in the GDF15 promoter confers high specificity for p53 activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *354*, 913–918.
- Ozemek, C., Laddu, D.R., Lavie, C.J., Claeys, H., Kaminsky, L.A., Ross, R., Wisloff, U., Arena, R., and Blair, S.N. (2018). An Update on the Role of Cardiorespiratory Fitness, Structured Exercise and Lifestyle Physical Activity in Preventing Cardiovascular Disease and Health Risk. *Prog. Cardiovasc. Dis.* *61*, 484-490.
- Paralkar, V.M., Vail, A.L., Grasser, W.A., Brown, T.A., Xu, H., Vukicevic, S., Ke, H.Z., Qi, H., Owen, T.A., and Thompson, D.D. (1998). Cloning and characterization of a novel member of the transforming growth factor-beta/bone morphogenetic protein family. *J. Biol. Chem.* *273*, 13760–13767.
- Park, S.-H., Choi, H.J., Yang, H., Do, K.H., Kim, J., Kim, H.-H., Lee, H., Oh, C.G., Lee, D.W., and Moon, Y. (2012). Two In-and-out Modulation Strategies for Endoplasmic Reticulum Stress-linked Gene Expression of Pro-apoptotic Macrophage-inhibitory Cytokine 1. *J. Biol. Chem.* *287*, 19841–19855.

Patil, C.L., Abrams, E.T., Steinmetz, A.R., and Young, S.L. (2012). Appetite Sensations and Nausea and Vomiting in Pregnancy: An Overview of the Explanations. *Ecol. Food Nutr.* *51*, 394–417.

Petrovic, N., Walden, T.B., Shabalina, I.G., Timmons, J.A., Cannon, B., and Nedergaard, J. (2010). Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *J. Biol. Chem.* *285*, 7153–7164.

Petry, C.J., Ong, K.K., Burling, K.A., Barker, P., Goodburn, S.F., Perry, J.R.B., Acerini, C.L., Hughes, I.A., Painter, R.C., Afink, G.B., et al. (2018). Associations of vomiting and antiemetic use in pregnancy with levels of circulating GDF15 early in the second trimester: A nested case-control study. *Wellcome Open Res.* *3*, 123.

Planavila, A., Redondo, I., Hondares, E., Vinciguerra, M., Munts, C., Iglesias, R., Gabrielli, L.A., Sitges, M., Giralt, M., van Bilsen, M., et al. (2013). Fibroblast growth factor 21 protects against cardiac hypertrophy in mice. *Nat. Commun.* *4*, 2019.

Pope, M., Budge, H., and Symonds, M.E. (2014). The developmental transition of ovine adipose tissue through early life. *Acta Physiol.* *210*, 20–30.

Popkin, B.M., Adair, L.S., and Ng, S.W. (2012). Global nutrition transition and the pandemic of obesity in developing countries. *Nutr. Rev.* *70*, 3–21.

Puigserver, P., Wu, Z., Park, C.W., Graves, R., Wright, M., and Spiegelman, B.M. (1998). A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* *92*, 829–839.

Purnell, J.Q. (2000). Definitions, Classification, and Epidemiology of Obesity (MDText.com, Inc.).

Quesada-López, T., Cereijo, R., Turatsinze, J.-V., Planavila, A., Cairó, M., Gavaldà-Navarro, A., Peyrou, M., Moure, R., Iglesias, R., Giralt, M., et al. (2016). The lipid sensor GPR120 promotes brown fat activation and FGF21 release from adipocytes. *Nat. Commun.* *7*, 13479.

Rao, R.R., Long, J.Z., White, J.P., Svensson, K.J., Lou, J., Lokurkar, I., Jedrychowski, M.P., Ruas, J.L., Wrann, C.D., Lo, J.C., et al. (2014). Meteorin-like is a hormone that regulates immune-adipose interactions to increase beige fat thermogenesis. *Cell* *157*, 1279–1291.

Rasmussen, A.T. (1923). The so-called hibernating gland. *J. Morphol.* *38*, 147–205.

Reid, S.A., Speedy, D.B., Thompson, J.M.D., Noakes, T.D., Mulligan, G., Page, T., Campbell, R.G.D., and Milne, C. (2004). Study of hematological and biochemical parameters in runners completing a standard marathon. *Clin. J. Sport Med.* *14*, 344–353.

- Ribas, F., Villarroya, J., Hondares, E., Giralt, M., and Villarroya, F. (2014). FGF21 expression and release in muscle cells: involvement of MyoD and regulation by mitochondria-driven signalling. *Biochem J* 199, 191–199.
- Roberts, L.D., Boström, P., O'Sullivan, J.F., Schinzel, R.T., Lewis, G.D., Dejam, A., Lee, Y.-K., Palma, M.J., Calhoun, S., Georgiadi, A., et al. (2014). β -Aminoisobutyric acid induces browning of white fat and hepatic β -oxidation and is inversely correlated with cardiometabolic risk factors. *Cell Metab.* 19, 96–108.
- Rodbell, M. (1964). Metabolism of isolated fat cells. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *J. Biol. Chem.* 239, 375–380.
- Rohatgi, A., Patel, P., Das, S.R., Ayers, C.R., Khera, A., Martinez-Rumayor, A., Berry, J.D., McGuire, D.K., and de Lemos, J.A. (2012). Association of growth differentiation factor-15 with coronary atherosclerosis and mortality in a young, multiethnic population: observations from the Dallas Heart Study. *Clin. Chem.* 58, 172–182.
- Rosell, M., Hondares, E., Iwamoto, S., Gonzalez, F.J., Wabitsch, M., Staels, B., Olmos, Y., Monsalve, M., Giralt, M., Iglesias, R., et al. (2012). Peroxisome Proliferator-Activated Receptors- α and - γ , and cAMP-Mediated Pathways, Control Retinol-Binding Protein-4 Gene Expression in Brown Adipose Tissue. *Endocrinology* 153, 1162–1173.
- Rosen, E.D., and Spiegelman, B.M. (2014). What We Talk About When We Talk About Fat. *Cell* 156, 20–44.
- Rosenfeld, R.G., and Hwa, V. (2009). The Growth Hormone Cascade and Its Role in Mammalian Growth. *Horm. Res. Paediatr.* 71, 36–40.
- Sarma, M. (2000). GDNF - a stranger in the TGF- β superfamily? *Eur. J. Biochem.* 267, 6968–6971.
- Sakamoto, T., Nitta, T., Maruno, K., Yeh, Y.-S., Kuwata, H., Tomita, K., Goto, T., Takahashi, N., and Kawada, T. (2016). Macrophage infiltration into obese adipose tissues suppresses the induction of UCP1 level in mice. *Am. J. Physiol. Metab.* 310, E676–E687.
- Sanchez-Gurmaches, J., and Guertin, D.A. (2014). Adipocytes arise from multiple lineages that are heterogeneously and dynamically distributed. *Nat. Commun.* 5, 4099.
- Sanchis-Gomar, F., Bonaguri, C., Aloe, R., Pareja-Galeano, H., Martinez-Bello, V., Gomez-Cabrera, M.C., Candel, J., Viña, J., and Lippi, G. (2013). Effects of acute exercise and xanthine oxidase inhibition on novel cardiovascular biomarkers. *Transl. Res.* 162, 102–109.
- Sargeant, J.A., Aithal, G.P., Takamura, T., Misu, H., Takayama, H., Douglas, J.A., Turner, M.C., Stensel, D.J., Nimmo, M.A., Webb, D.R., et al. (2018). The influence of adiposity and acute exercise on circulating hepatokines in normal-weight and overweight/obese men. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 43, 482–490.

- Sarzani, P., Dessì-Fulgheri, P., Paci, V.M., Espinosa, E., and Rappelli, A. (1996). Expression of natriuretic peptide receptors in human adipose and other tissues. *J. Endocrinol. Invest.* *19*, 581–585.
- Schoettl, T., Fischer, I.P., and Ussar, S. (2018). Heterogeneity of adipose tissue in development and metabolic function. *J. Exp. Biol.* *221*, jeb162958.
- Schopfer, D.W., Ku, I.A., Regan, M., and Whooley, M.A. (2014). Growth differentiation factor 15 and cardiovascular events in patients with stable ischemic heart disease (The Heart and Soul Study). *Am. Heart J.* *167*, 186–192.
- Schulz, T.J., and Tseng, Y.-H. (2013). Brown adipose tissue: development, metabolism and beyond. *Biochem. J.* *453*, 167–178.
- Seale, P., Bjork, B., Yang, W., Kajimura, S., Chin, S., Kuang, S., Scimè, A., Devarakonda, S., Conroe, H.M., Erdjument-Bromage, H., et al. (2008). PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature* *454*, 961–967.
- Sebastiani, G., Díaz, M., Bassols, J., Aragonés, G., López-Bermejo, A., de Zegher, F., and Ibáñez, L. (2016). The sequence of prenatal growth restraint and post-natal catch-up growth leads to a thicker intima-media and more pre-peritoneal and hepatic fat by age 3-6 years. *Pediatr. Obes.* *11*, 251–257.
- Segerer, S.E., Rieger, L., Kapp, M., Dombrowski, Y., Müller, N., Dietl, J., and Kämmerer, U. (2012). MIC-1 (a multifunctional modulator of dendritic cell phenotype and function) is produced by decidual stromal cells and trophoblasts. *Hum. Reprod.* *27*, 200–209.
- Shi, F., and Collins, S. (2017). Second messenger signaling mechanisms of the brown adipocyte thermogenic program: an integrative perspective. *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.* *26*.
- Shukla, L., Morrison, W.A., and Shayan, R. (2015). Adipose-derived stem cells in radiotherapy injury: a new frontier. *Front. Surg.* *2*, 1.
- Silva, P.N., Altamentova, S.M., Kilkenny, D.M., and Rocheleau, J. V. (2013). Fibroblast Growth Factor Receptor Like-1 (FGFRL1) Interacts with SHP-1 Phosphatase at Insulin Secretory Granules and Induces Beta-cell ERK1/2 Protein Activation. *J. Biol. Chem.* *288*, 17859–17870.
- Slusher, A.L., Whitehurst, M., Zoeller, R.F., Mock, J.T., Maharaj, M., and Huang, C.-J. (2015). Attenuated fibroblast growth factor 21 response to acute aerobic exercise in obese individuals. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* *25*, 839–845.
- Smith, R.E., and Roberts, J.C. (1964). Thermogenesis of brown adipose tissue in cold-acclimated rats. *Am. J. Physiol.* *Content 206*, 143–148.
- Smith, R.E., and Hock, R.J. (1963). Brown fat: thermogenic effector of arousal in hibernators. *Science* *140*, 199–200.

Smith, R.E., and Hoijer, D.J. (1962). Metabolism and cellular function in cold acclimation. *Physiol. Rev.* *42*, 60–142.

Sottile, V., and Seuwen, K. (2000). Bone morphogenetic protein-2 stimulates adipogenic differentiation of mesenchymal precursor cells in synergy with BRL 49653 (rosiglitazone). *FEBS Lett.* *475*, 201–204.

Staiger, H., Keuper, M., Berti, L., Hrabě de Angelis, M., and Häring, H.-U. (2017). Fibroblast Growth Factor 21—Metabolic Role in Mice and Men. *Endocr. Rev.* *38*, 468–488.

Sugulle, M., Dechend, R., Herse, F., Weedon-Fekjaer, M.S., Johnsen, G.M., Brosnihan, K.B., Anton, L., Luft, F.C., Wollert, K.C., Kempf, T., et al. (2009). Circulating and Placental Growth-Differentiation Factor 15 in Preeclampsia and in Pregnancy Complicated by Diabetes Mellitus. *Hypertension* *54*, 106–112.

Suomalainen, A., Elo, J.M., Pietiläinen, K.H., Hakonen, A.H., Sevastianova, K., Korpela, M., Isohanni, P., Marjavaara, S.K., Tyni, T., Kiuru-Enari, S., et al. (2011). FGF-21 as a biomarker for muscle-manifesting mitochondrial respiratory chain deficiencies: a diagnostic study. *Lancet. Neurol.* *10*, 806–818.

Symonds, M.E., Pope, M., and Budge, H. (2015). The Ontogeny of Brown Adipose Tissue. *Annu. Rev. Nutr.* *35*, 295–320.

Tan, M., Wang, Y., Guan, K., and Sun, Y. (2000). PTGF-beta, a type beta transforming growth factor (TGF-beta) superfamily member, is a p53 target gene that inhibits tumor cell growth via TGF-beta signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 109–114.

Tantawy, A.A.G., Adly, A.A.M., Ismail, E.A.R., Darwish, Y.W., and Zedan, M.A. (2014). Growth differentiation factor-15 in young sickle cell disease patients: Relation to hemolysis, iron overload and vascular complications. *Blood Cells, Mol. Dis.* *53*, 189–193.

Tchou, I., Margeli, A., Tsironi, M., Skenderi, K., Barnet, M., Kanaka-Gantenbein, C., Papassotiriou, I., and Beris, P. (2009). Growth-differentiation factor-15, endoglin and N-terminal pro-brain natriuretic peptide induction in athletes participating in an ultramarathon foot race. *Biomarkers* *14*, 418–422.

Townsend, K.L., and Tseng, Y.-H. (2014). Brown fat fuel utilization and thermogenesis. *Trends Endocrinol. Metab.* *25*, 168–177.

Tran, T., Yang, J., Gardner, J., and Xiong, Y. (2018). GDF15 deficiency promotes high fat diet-induced obesity in mice. *PLoS One* *13*, e0201584.

Tsai, V.W.-W., Manandhar, R., Jørgensen, S.B., Lee-Ng, K.K.M., Zhang, H.P., Marquis, C.P., Jiang, L., Husaini, Y., Lin, S., Sainsbury, A., et al. (2014). The Anorectic Actions of the TGFβ Cytokine MIC-1/GDF15 Require an Intact Brainstem Area Postrema and Nucleus of the Solitary Tract. *PLoS One* *9*, e100370.

- Tsai, V.W.-W., Macia, L., Feinle-Bisset, C., Manandhar, R., Astrup, A., Raben, A., Lorenzen, J.K., Schmidt, P.T., Wiklund, F., Pedersen, N.L., et al. (2015). Serum Levels of Human MIC-1/GDF15 Vary in a Diurnal Pattern, Do Not Display a Profile Suggestive of a Satiety Factor and Are Related to BMI. *PLoS One* *10*, e0133362.
- Tsai, V.W.W., Macia, L., Johnen, H., Kuffner, T., Manadhar, R., Jørgensen, S.B., Lee-Ng, K.K.M., Zhang, H.P., Wu, L., Marquis, C.P., et al. (2013). TGF- β Superfamily Cytokine MIC-1/GDF15 Is a Physiological Appetite and Body Weight Regulator. *PLoS One* *8*, 0–8.
- Tsai, V.W.W., Husaini, Y., Sainsbury, A., Brown, D.A., and Breit, S.N. (2018). The MIC-1/GDF15-GFRAL Pathway in Energy Homeostasis: Implications for Obesity, Cachexia, and Other Associated Diseases. *Cell Metab.* *28*, 353–368.
- Tseng, Y.-H., Kokkotou, E., Schulz, T.J., Huang, T.L., Winnay, J.N., Taniguchi, C.M., Tran, T.T., Suzuki, R., Espinoza, D.O., Yamamoto, Y., et al. (2008). New role of bone morphogenetic protein 7 in brown adipogenesis and energy expenditure. *Nature* *454*, 1000–1004.
- Verdeguer, F., Soustek, M.S., Hatting, M., Blättler, S.M., McDonald, D., Barrow, J.J., and Puigserver, P. (2015). Brown Adipose YY1 Deficiency Activates Expression of Secreted Proteins Linked to Energy Expenditure and Prevents Diet-Induced Obesity. *Mol. Cell. Biol.* *36*, 184–196.
- Villarroya, F., and Vidal-Puig, A. (2013). Beyond the sympathetic tone: the new brown fat activators. *Cell Metab.* *17*, 638–643.
- Villarroya, F., Cereijo, R., Villarroya, J., and Giral, M. (2016). Brown adipose tissue as a secretory organ. *Nat. Rev. Endocrinol.* *13*, 26–35.
- Villarroya, F., Cereijo, R., Villarroya, J., Gavaldà-Navarro, A., and Giral, M. (2018). Toward an Understanding of How Immune Cells Control Brown and Beige Adipobiology. *Cell Metab.* *27*, 954–961.
- Virtanen, K.A., Lidell, M.E., Orava, J., Heglind, M., Westergren, R., Niemi, T., Taittonen, M., Laine, J., Savisto, N.-J., Enerbäck, S., et al. (2009). Functional Brown Adipose Tissue in Healthy Adults. *N. Engl. J. Med.* *360*, 1518–1525.
- Wabitsch, M., Brenner, R.E., Melzner, I., Braun, M., Möller, P., Heinze, E., Debatin, K.M., and Hauner, H. (2001). Characterization of a human preadipocyte cell strain with high capacity for adipose differentiation. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* *25*, 8–15.
- Wallentin, L., Zethelius, B., Berglund, L., Eggers, K.M., Lind, L., Lindahl, B., Wollert, K.C., and Siegbahn, A. (2013). GDF-15 for Prognostication of Cardiovascular and Cancer Morbidity and Mortality in Men. *PLoS One* *8*, e78797.
- Wang, X. (2013). Structural studies of GDNF family ligands with their receptors-Insights into ligand recognition and activation of receptor tyrosine kinase RET. *Biochim. Biophys. Acta* *1834*, 2205–2212.

- Wang, W., and Seale, P. (2016). Control of brown and beige fat development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17, 691–702.
- Wang, F., Kan, M., Yan, G., Xu, J., and McKeenan, W.L. (1995). Alternately spliced NH₂-terminal immunoglobulin-like Loop I in the ectodomain of the fibroblast growth factor (FGF) receptor 1 lowers affinity for both heparin and FGF-1. *J. Biol. Chem.* 270, 10231–10235.
- Wang, T., Huang, T., Li, Y., Zheng, Y., Manson, J.E., Hu, F.B., and Qi, L. (2016). Low birthweight and risk of type 2 diabetes: a Mendelian randomisation study. *Diabetologia* 59, 1920–1927.
- Wang, X.-B., Jiang, X.-R., Yu, X.-Y., Wang, L., He, S., Feng, F.-Y., Guo, L.-P., Jiang, W., and Lu, S.-H. (2014). Macrophage inhibitory factor 1 acts as a potential biomarker in patients with esophageal squamous cell carcinoma and is a target for antibody-based therapy. *Cancer Sci.* 105, 176–185.
- Wang, X., Kingsley, P.J., Marnett, L.J., and Eling, T.E. (2011). The role of NAG-1/GDF15 in the inhibition of intestinal polyps in APC/Min mice by sulindac. *Cancer Prev. Res. (Phila).* 4, 150–160.
- Watanabe, M., Houten, S.M., Matak, C., Christoffolete, M.A., Kim, B.W., Sato, H., Messaddeq, N., Harney, J.W., Ezaki, O., Kodama, T., et al. (2006). Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. *Nature* 439, 484–489.
- Weigert, C., Hoene, M., and Plomgaard, P. (2019). Hepatokines—a novel group of exercise factors. *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* 471, 383–396.
- Wente, W., Efanov, A.M., Brenner, M., Kharitonov, A., Köster, A., Sandusky, G.E., Sewing, S., Treinies, I., Zitzer, H., and Gromada, J. (2006). Fibroblast Growth Factor-21 Improves Pancreatic β -Cell Function and Survival by Activation of Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 and Akt Signaling Pathways. *Diabetes* 55, 2470–2478.
- Whittle, A.J., Carobbio, S., Martins, L., Slawik, M., Hondares, E., Vázquez, M.J., Morgan, D., Csikasz, R.I., Gallego, R., Rodriguez-Cuenca, S., et al. (2012). BMP8B increases brown adipose tissue thermogenesis through both central and peripheral actions. *Cell* 149, 871–885.
- Wiklund, F.E., Bennet, A.M., Magnusson, P.K.E., Eriksson, U.K., Lindmark, F., Wu, L., Yaghoutyfam, N., Marquis, C.P., Stattin, P., Pedersen, N.L., et al. (2010). Macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1/GDF15): a new marker of all-cause mortality. *Aging Cell* 9, 1057–1064.
- Wollert, K.C., Kempf, T., Lagerqvist, B., Lindahl, B., Olofsson, S., Allhoff, T., Peter, T., Siegbahn, A., Venge, P., Drexler, H., et al. (2007). Growth Differentiation Factor 15 for Risk Stratification and Selection of an Invasive Treatment Strategy in Non-ST-Elevation Acute Coronary Syndrome. *Circulation* 116, 1540–1548.

- Wollert, K.C., Kempf, T., and Wallentin, L. (2017). Growth Differentiation Factor 15 as a Biomarker in Cardiovascular Disease. *Clin. Chem.* 63, 140–151.
- Woo, Y.C., Xu, A., Wang, Y., and Lam, K.S.L. (2013). Fibroblast Growth Factor 21 as an emerging metabolic regulator: clinical perspectives. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. 78, 489–496.
- Worthmann, A., John, C., Rühlemann, M.C., Baguhl, M., Heinsen, F.-A., Schaltenberg, N., Heine, M., Schlein, C., Evangelakos, I., Mineo, C., et al. (2017). Cold-induced conversion of cholesterol to bile acids in mice shapes the gut microbiome and promotes adaptive thermogenesis. *Nat. Med.* 23, 839–849.
- Xiong, Y., Walker, K., Min, X., Hale, C., Tran, T., Komorowski, R., Yang, J., Davda, J., Nuanmanee, N., Kemp, D., et al. (2017). Long-acting MIC-1/GDF15 molecules to treat obesity: Evidence from mice to monkeys. *Sci. Transl. Med.* 18.
- Xu, J., Kimball, T.R., Lorenz, J.N., Brown, D.A., Bauskin, A.R., Klevitsky, R., Hewett, T.E., Breit, S.N., and Molkentin, J.D. (2006). GDF15/MIC-1 Functions As a Protective and Antihypertrophic Factor Released From the Myocardium in Association With SMAD Protein Activation. *Circ. Res.* 98, 342–350.
- Xu, X., Li, Z., and Gao, W. (2011). Growth differentiation factor 15 in cardiovascular diseases: from bench to bedside. *Biomarkers* 16, 466–475.
- Xue, H., Fu, Z., Chen, Y., Xing, Y., Liu, J., Zhu, H., and Zhou, X. (2012). The Association of Growth Differentiation Factor-15 with Left Ventricular Hypertrophy in Hypertensive Patients. *PLoS One* 7, e46534.
- Yang, L., Chang, C.-C., Sun, Z., Madsen, D., Zhu, H., Padkjær, S.B., Wu, X., Huang, T., Hultman, K., Paulsen, S.J., et al. (2017). GFRAL is the receptor for GDF15 and is required for the anti-obesity effects of the ligand. *Nat. Med.* 23, 1158–1166.
- Yatsuga, S., Fujita, Y., Ishii, A., Fukumoto, Y., Arahata, H., Kakuma, T., Kojima, T., Ito, M., Tanaka, M., Saiki, R., et al. (2015). Growth differentiation factor 15 as a useful biomarker for mitochondrial disorders. *Ann. Neurol.* 78, 814–823.
- Yeo, C.R., Agrawal, M., Hoon, S., Shabbir, A., Shrivastava, M.K., Huang, S., Khoo, C.M., Chhay, V., Yassin, M.S., Tai, E.S., et al. (2017). SGBS cells as a model of human adipocyte browning: A comprehensive comparative study with primary human white subcutaneous adipocytes. *Sci. Rep.* 7, 4031.
- Yilmaz, H., Çelik, H.T., Gurel, O.M., Bilgic, M.A., Namuslu, M., Bozkurt, H., Ayyildiz, A., Inan, O., Bavbek, N., and Akcay, A. (2015). Increased serum levels of GDF-15 associated with mortality and subclinical atherosclerosis in patients on maintenance hemodialysis. *Herz* 40, 305–312.
- Young, P., Arch, J.R., and Ashwell, M. (1984). Brown adipose tissue in the parametrial fat pad of the mouse. *FEBS Lett.* 167, 10–14.

de Zegher, F., Sebastiani, G., Diaz, M., Sánchez-Infantes, D., Lopez-Bermejo, A., and Ibáñez, L. (2012a). Body composition and circulating high-molecular-weight adiponectin and IGF-I in infants born small for gestational age: breast- versus formula-feeding. *Diabetes* 61, 1969–1973.

de Zegher, F., Diaz, M., Sebastiani, G., Martin-Ancel, A., Sanchez-Infantes, D., Lopez-Bermejo, A., and Ibanez, L. (2012b). Abundance of Circulating Preadipocyte Factor 1 in Early Life. *Diabetes Care* 35, 848–849.

Zhang, Q., Yu, N., and Lee, C. (2014). Mysteries of TGF- β Paradox in Benign and Malignant Cells. *Front. Oncol.* 4, 94.

Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., and Friedman, J.M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372, 425–432.

Zhu, C.-H., Mouly, V., Cooper, R.N., Mamchaoui, K., Bigot, A., Shay, J.W., Di Santo, J.P., Butler-Browne, G.S., and Wright, W.E. (2007). Cellular senescence in human myoblasts is overcome by human telomerase reverse transcriptase and cyclin-dependent kinase 4: consequences in aging muscle and therapeutic strategies for muscular dystrophies. *Aging Cell* 6, 515–523.

APÈNDIX

GDF-15 is elevated in children with mitochondrial diseases and is induced by mitochondrial dysfunction

Revista: PLOS ONE

PMID: 26867126

Títol: GDF15 es troba augmentat en nens amb patologia mitocondrial i s'indueix amb la disfunció mitocondrial

Resum:

Anteriorment, vam descriure nivells elevats de GDF15 en múscul esquelètic i en plasma en pacients de patologia mitocondrial. En aquest estudi avaluem el factor GDF15 com a biomarcador de patologia mitocondrial en nens i el comparem amb el factor FGF21. Per tal d'investigar el mecanisme d'inducció de GDF15 en aquestes patologies, hem mesurat la seva expressió i secreció en resposta a la disfunció mitocondrial.

Els resultats obtinguts mostren un augment dels nivells de GDF15 circulants en nens amb patologia mitocondrial (mitjana 4046 pg/ml, 1492 SEM) en relació amb controls sans (350, 21) i amb controls de miopatia no mitocondrial (350, 32). L'àrea de sota la corba per a la corba ROC va ser de 0,82, indicant un bon poder discriminatori per GDF15. Pel valor de tall de 550 pg/ml de GDF15, la sensibilitat trobada va ser del 67,8% (54,4%-79,4%) i l'especificitat del 92,3% (81,5%-97,9%). Utilitzant els valors de GDF15 i FGF21 en combinació es van poder identificar correctament un nombre més elevat de pacients que utilitzant aquests dos factors per separat. Tant el nivells d'mRNA com de proteïna secretada al medi dels dos factors (GDF15 i FGF21) s'indueixen significativament després del tractament de miotubs amb oligomicina i antimicina A. Trobem una correlació positiva entre els nivells de GDF15 i els nivells d'FGF21 en resposta a aquests dos tractaments.

Els resultats d'aquest estudi indiquen que GDF15 és un valuós biomarcador per al diagnòstic de patologies mitocondrials en nens, i que la utilització de GDF15 i FGF21 alhora millora la capacitat de detecció d'aquestes, en comparació amb els dos factors per separat. Finalment, es demostra per primera vegada que la proteïna GDF15 és produïda i secretada per les cèl·lules musculars en resposta a la disfunció mitocondrial, i que els seus nivells correlacionen *in vitro* amb els nivells d'FGF21.

RESEARCH ARTICLE

GDF-15 Is Elevated in Children with Mitochondrial Diseases and Is Induced by Mitochondrial Dysfunction

Raquel Montero^{1,2,3}, Delia Yubero^{1,2,3}, Joan Villarroya^{3,4}, Desiree Henares⁵, Cristina Jou^{2,3,6}, Maria Angeles Rodriguez^{3,5}, Federico Ramos⁷, Andrés Nascimento^{2,3,5}, Carlos Ignacio Ortez^{3,5}, Jaime Campistol^{2,3,7}, Belen Perez-Dueñas^{2,3,7}, Mar O'Callaghan^{3,7}, Mercedes Pineda^{2,3}, Angeles Garcia-Cazorla^{2,3,7}, Jaime Colomer Oferil⁵, Julio Montoya^{2,8}, Eduardo Ruiz-Pesini^{2,8,9}, Sonia Emperador^{2,8}, Marija Meznaric¹⁰, Laura Campderros^{3,4}, Susana G. Kalko¹¹, Francesc Villarroya^{3,4}, Rafael Artuch^{1,2,3}, Cecilia Jimenez-Mallebrera^{2,3,5*}



 OPEN ACCESS

Citation: Montero R, Yubero D, Villarroya J, Henares D, Jou C, Rodriguez MA, et al. (2016) GDF-15 Is Elevated in Children with Mitochondrial Diseases and Is Induced by Mitochondrial Dysfunction. PLoS ONE 11(2): e0148709. doi:10.1371/journal.pone.0148709

Editor: Gisela Nogales-Gadea, Institut de Recerca de la Santa Creu i Sant Pau, SPAIN

Received: October 23, 2015

Accepted: January 20, 2016

Published: February 11, 2016

Copyright: © 2016 Montero et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its supporting information files.

Funding: This work was funded by the "Plan Nacional de I+D+I and Instituto de Salud Carlos III-Subdirección General de Evaluación y Fomento de la Investigación Sanitaria", projects PI10/00177 (CJM), PI13/00837 (MAR, CJ, AN, JC, CJM), PI14/00028 (RA), PI14/00005 (SE, JM) and the European Regional Development Fund (FEDER). MAR is sponsored by the Hospital Sant Joan de Déu Reserch Grants. CJM is funded by the Instituto de Salud Carlos III grant CP09/00011. JM is funded by Departamento de Ciencia, Tecnología y Universidad

1 Clinical Biochemistry Department, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain, 2 Center for Biomedical Research on Rare Diseases (CIBERER), Madrid, Spain, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain, 3 Institute of Pediatric Research Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain, 4 Biochemistry and Molecular Biology Department, Biomedical Institute University of Barcelona (IBUB), Center for Biomedical Research on Obesity and Nutrition (CIBEROBN), Madrid, Spain, 5 Neuromuscular Unit, Neuropaediatrics Department, Hospital Sant Joan de Déu, Fundacion Sant Joan de Deu, Barcelona, Spain, 6 Pathology Department, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain, 7 Neuropaediatrics Department, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain, 8 Biochemistry and Molecular Biology Department, University of Zaragoza, Zaragoza, Spain, 9 Fundación ARAID, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Spain, 10 Institute of Anatomy, Faculty of Medicine, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia, 11 Bioinformatics Core Facility, IDIBAPS, Hospital Clinic, Barcelona, Spain

* cjimenezm@hsjdbcn.org

Abstract

Background

We previously described increased levels of growth and differentiation factor 15 (GDF-15) in skeletal muscle and serum of patients with mitochondrial diseases. Here we evaluated GDF-15 as a biomarker for mitochondrial diseases affecting children and compared it to fibroblast-growth factor 21 (FGF-21). To investigate the mechanism of GDF-15 induction in these pathologies we measured its expression and secretion in response to mitochondrial dysfunction.

Methods

We analysed 59 serum samples from 48 children with mitochondrial disease, 19 samples from children with other neuromuscular diseases and 33 samples from aged-matched healthy children. GDF-15 and FGF-21 circulating levels were determined by ELISA.

Results

Our results showed that in children with mitochondrial diseases GDF-15 levels were on average increased by 11-fold (mean 4046pg/ml, 1492 SEM) relative to healthy (350, 21) and myopathic (350, 32) controls. The area under the curve for the receiver-operating-

del Gobierno de Aragón (Grupos Consolidados B33). JV, LC and FV are funded by grants from the "Ministerio de Economía y Competitividad, MINECO" (SAF2014-55725-R) and "Generalitat de Catalunya" (2014SGR-141).

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

characteristic curve for GDF-15 was 0.82 indicating that it has a good discriminatory power. The overall sensitivity and specificity of GDF-15 for a cut-off value of 550pg/mL was 67.8% (54.4%-79.4%) and 92.3% (81.5%-97.9%), respectively. We found that elevated levels of GDF-15 and or FGF-21 correctly identified a larger proportion of patients than elevated levels of GDF-15 or FGF-21 alone. GDF-15, as well as FGF-21, mRNA expression and protein secretion, were significantly induced after treatment of myotubes with oligomycin and that levels of expression of both factors significantly correlated.

Conclusions

Our data indicate that GDF-15 is a valuable serum quantitative biomarker for the diagnosis of mitochondrial diseases in children and that measurement of both GDF-15 and FGF-21 improves the disease detection ability of either factor separately. Finally, we demonstrate for the first time that GDF-15 is produced by skeletal muscle cells in response to mitochondrial dysfunction and that its levels correlate *in vitro* with FGF-21 levels.

Introduction

Mitochondrial diseases are a group of heterogeneous disorders in which the main feature is dysfunction of the mitochondrial respiratory chain leading to defective ATP production. They are the most common group of metabolic diseases with an estimated prevalence in the population of approximately 1 in 5000. Clinically, they are characterized by multisystemic involvement generally affecting tissues with high energy demand [1], [2].

Diagnosis of mitochondrial diseases is very complex. This is particularly true in children due to the complexity of the clinical presentations and lack of classical diagnostic clues such as ragged-red fibres in muscle biopsy. Accurate guidelines have been published which take into account clinical symptoms and biochemical and histopathological criteria [3], [4], [5]. Although the gold-standard is genetic confirmation often the genetic basis of the disease remains unidentified [6], [7].

As first-line investigations, analysis of metabolites in blood, urine and CSF has been used to help in the diagnosis of these patients although they may lack both sensitivity and specificity (e.g. lactate, pyruvate, alanine or organic acids) emphasizing the requirement of better biomarkers [8], [9]. The next step in diagnosis usually involves muscle biopsy investigations (enzymatic activity of the complexes of the respiratory chain). However, this is not always available and in some cases enzyme activity is difficult to interpret.

Fibroblast Growth Factor 21 (FGF-21) has been introduced as a valuable serum biomarker for the detection muscle manifesting mitochondrial disorders [10].

We recently described growth and differentiation factor 15 (GDF-15) as a potential novel biomarker for mitochondrial diseases. GDF-15 mRNA levels were dramatically increased in muscle from patients with *TK2* mutations and the protein was constitutively secreted by skeletal muscle cells. Consistent with this, we found significantly elevated circulating levels of GDF-15 in a small group of patients with a genetic diagnosis of mitochondrial disease [11]. GDF-15 is a cytokine of the Transforming Growth Factor β (TGF- β) superfamily which is expressed mainly in placenta, kidney, liver, lung, pancreas and prostate [12], [13], [14]. This cytokine has an essential role in regulating the cellular response to stress signals and inflammation and has been related with suppression of inflammation in early pregnancy, tumorigenic processes and

cardiovascular diseases where is produced by cardiac myocytes in response to ischemia, nitrosative or oxidative stress and angiotensin II [15]. In the CNS, GDF-15 is expressed in the choroid plexus and acts as a potent neurotrophic factor for motor and sensory neurons [16].

With the purpose to evaluate the diagnostic application of GDF-15 we studied its circulating levels in children with mitochondrial encephalomyopathies and other non-mitochondrial neuromuscular diseases and correlated its levels with FGF-21 and various metabolites and clinical signs. We also investigated mRNA expression and protein secretion for both factors in murine and human myotubes under different conditions.

Materials and Methods

Ethical statement

The study was approved by the Ethical Committee of the Hospital San Joan de Déu and samples from patients and controls were obtained according to the Helsinki Declarations of 1964, as revised in 2001. Written informed consent for genetic analysis was obtained from patients or their parents/guardians.

Patients

For this study we included 48 patients for whom we had sufficient clinical, biochemical, and histopathological information to allow us to reach a diagnosis of mitochondrial disease. They were structured into three groups according to Morava criteria. Briefly, this is a scoring system which takes into account clinical (skeletal system, central nervous system, multiorgan disease), metabolic (e.g. elevated lactate and alanine), imaging (e.g. Leigh syndrome lesions on brain MRI) and morphological (e.g. presence of ragged-red and cytochrome c oxidase negative fibers) parameters. Depending on the total score obtained patients are classified with a “definitive”, “probable”, “possible” or “unlikely” mitochondrial disorder [4].

Group 1 consisted of patients with molecularly confirmed mutations in mitochondrial or nuclear DNA (n° patients/samples = 16/22; age range 1–16 yrs). Group 2 were patients with definitive mitochondrial disease following the Morava criteria but no genetic diagnosis (n° patients/samples = 15/20; age range 1 month to 17 yrs) and Group 3 were patients with a probable diagnosis of mitochondrial disease according to the same criteria and also without genetic confirmation (n° patients/samples = 17/17, age; range 1 month to 16 yrs). We collected data regarding age at onset, diagnosis, involvement of skeletal muscle, central nervous system, heart, liver and kidney. Patient information with the corresponding levels of circulating GDF-15 and FGF-21 are detailed in [S1 Table](#).

We also studied a group of patients with non-mitochondrial myopathies, Group 4 (n° patients/samples = 19/19; range 2 months to 18 years) ([S1 Table](#)). We selected an age-matched pediatric cohort (n° patients/samples = 33/33; age range 1 month to 18 years) as the control group (Group 5). All controls were healthy subjects who came to the hospital for minor medical interventions.

Samples

Serum and plasma samples were collected in fasting conditions, separated and stored at -80°C until the moment of the analysis.

Biochemical analysis

Routine biochemical parameters (blood count, ions, glucose, insulin, hepatic and renal function, lipid and iron metabolism, lactate and pyruvate) were performed by standardized

automatic analysis. Plasma amino acids (alanine) were measured by ion exchange chromatography with ninhydrin derivatization and organic acids by gas-chromatography mass spectrometry [17].

GDF-15 and FGF-21 levels were quantified in serum or plasma samples and cell conditioned medium using human or mouse GDF-15 quantikine ELISA kit (R&D Biosystems) and FGF-21 ELISA KIT (Millipore) according to the manufacturer's instructions.

Molecular studies

In patients from group 1, the molecular studies were performed for identification of pathogenic mutations in mitochondrial or nuclear DNA. For this, genomic DNA was extracted from different biological samples (blood, muscle or urine) with standard procedures and molecular analyses in mitochondrial or nuclear DNA were performed according to the clinical and biochemical phenotype of the patients (O'Callaghan et al., 2014). In particular, point mutations in mtDNA associated to MELAS and NARP, were determined by PCR-RFLP (PCR-restriction fragment length polymorphism) using the appropriate specific oligonucleotides primers and restriction enzymes for each mutation; the digested products were electrophoresed in agarose gels. Single or multiple deletions in muscle mtDNA were determined by long-range PCR or Southern blot and analysis of mtDNA copy number was performed by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). Sequencing of TK2, POLG1, and mtDNA was carried out by automated DNA Sanger sequencing methods. The primers and conditions for these analyses are available upon request. Molecular diagnosis data is summarized in [S1 Table](#).

Histopathological analysis of muscle biopsy

Open muscle biopsy of the right deltoid or left quadriceps muscles were performed. Specimens were either frozen in isopentane cooled by liquid nitrogen for histological and histochemical analysis. Serial frozen sections were stained with standard techniques for hematoxylin and eosin, modified Gomori trichrome, nicotinamide adenine dinucleotide tetrazolium reductase (NADH), succinate dehydrogenase (SDH) and cytochrome c oxidase (COX), combined COX and SDH and Sudan black stain for lipids.

Cell culture

Mouse myoblastic C2C12 were obtained from the A.T.C.C. (Manassas, VA, U.S.A.). Cells were grown in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) containing 10% FBS. At 80% confluence, C2C12 were induced to differentiate into myotubes by changing the medium to DMEM containing 2% HS (horse serum) and DMEM containing 2% FBS respectively. LHCN-M2 human myoblastic cells [Zhu et al. 2007] (a gift from Dr W. Wright, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX, U.S.A.) were maintained in basal medium (DMEM/Medium 199, 4:1 dilution, 0.02 M Hepes, 0.03 µg/ml ZnSO₄ and 1.4 µg/ml vitamin B12) containing 15% FBS, 55 ng/ml dexamethasone, 0.01 mg/ml hepatocyte growth factor (Millipore), 0.025 mg/ml FGF (Biological Industries), 50 U/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin and 0.625 µg/ml fungizone. Differentiation of LHCN-M2 cells was induced by culturing in fusion medium (basal medium containing 0.5% FBS, 10 µg/ml insulin, 0.1 mg/ml apo-transferrin and 50 µg/ml dexamethasone) and then in differentiation medium (basal medium containing 0.5% FBS and 55 ng/ml dexamethasone). When indicated cells were treated with the ATP synthase inhibitor oligomycin (0.1 µM) or with the complex III inhibitor antimycin A (10 µM), drug concentrations that did not cause significant cytotoxicity in myotubes (Ribas et al, 2014), and/or 2 mM Trolox (soluble vitamin E derivative), 2 mM ascorbic acid or 2 mM N-acetyl cysteine. For induction of ER stress, myotubes were treated with tunicamycin (1 µM) and thapsigargin (1 µM).

In vitro studies and qRT-PCR

RNA was extracted using Tripure. The levels of FGF21 and myogenin mRNA were determined by qRT-PCR (quantitative reverse transcription—PCR). Reverse transcription was performed in a total volume of 20 μ l using random hexamer primers (Applied Biosystems), 0.5 μ g of total RNA, and the corresponding TaqMan[®] Assay-on-demand probes for mouse and human GDF-15 (Mm00442228; Hs00171132), FGF-21 (Mm00840165, Hs00173927) and GRP78 (Mm00517691, Hs99999174) transcripts. qPCR was performed using an ABI/Prism 7500 Sequence Detector System (Applied Biosystems). Each sample was run in duplicate, and the mean value of the duplicate was normalized to that of the 18 S rRNA (Hs99999901) gene using the comparative ($2^{-\Delta C_t}$) method.

Statistical methods

Statistical analysis was performed using SPSS V.22.0 and PRISM 6.0. Kolmogorov-Smirnov test was applied to determine the distribution of both GDF-15 and FGF-21 values in human samples. Data for GDF-15 and FGF-21 were not normally distributed and for this reason we applied a non-parametric test (U-Mann Whitney) to establish differences in GDF-15 and FGF-21 concentrations between groups and a minimum significance value of $p < 0.05$. The receiving operating characteristics (ROC) curves and area under the curve (AUC) were calculated with PRISM. Spearman Rank Coefficient was used to investigate GDF-15 and FGF-21 association and with other metabolic parameters. Chi-square test was applied to search for categorical associations between GDF-15 and FGF-21 levels and involvement of various organs (S1 Table). In the *in vitro* experimental settings in cells, Student's t test was used to test the level of significance of the differences between means. Pearson's correlation data were determined where indicated.

Results

GDF-15 and FGF21 circulating levels

The mean circulating concentration of GDF-15 was almost identical in healthy children (mean = 350.3, SEM = 21 pg/mL) and in myopathic non-mitochondrial controls (349.1 pg/mL) whereas FGF-21 was higher in children with myopathy (136.1 pg/mL) than in unaffected controls (77.6 pg/mL). The range in healthy controls was 155–584 pg/mL for GDF-15 and 21–285 pg/mL for FGF-21.

Mean GDF-15 and FGF-21 serum levels were on average 11 times higher in patients (when the three groups were taken together) than in healthy controls (4046, 1492 pg/ml and 885, 156 pg/ml respectively). The mean values and range of GDF-15 and FGF-21 concentrations for each group of patients and controls are summarized in Table 1.

In patients with a diagnosis of mitochondrial disease the levels of both cytokines were significantly elevated relative to healthy controls being the difference more significant in group 1 (confirmed) and 2 (definitive) than in group 3 (probable), (Fig 1). The difference for GDF-15 and FGF-21 when we compared groups 1, 2 and 3 with group 4 (myopathic controls) reached statistical significance in all cases except for the comparison between groups 3 and 4 in the case of FGF-21. Moreover we did not find significant differences between the myopathic and the healthy control groups or between groups 1, 2 and 3 (U-Mann Whitney test applied).

We observed a positive strong and significant correlation between FGF-21 and GDF-15 values in all patient groups (Spearman's test), (Fig 2). There was a positive correlation between GDF-15 and alanine transaminase (ALT) and aspartate transaminase (AST) in group 1 (AST $r = 0.65$ $p = 0.02$; ALT $r = 0.7$ $p = 0.01$) and in group 3 (AST $r = 0.72$ $p = 0.008$; ALT $r = 0.71$

Table 1. Serum concentration of GDF-15 and FGF-21 in patients and controls.

Group	GDF-15		
	Mean (pg/ul)	SEM	Range (pg/ul)
1	7593	3870	205–85252
2	20443	482.7	286–6926
3	1813	788.8	149–13370
4	349.1	32.21	147–809
5	350.3	20.69	155–584
Group	FGF-21		
	Mean (pg/ul)	SEM	Range (pg/ul)
1	966.5	231	25–3623
2	1106	345.7	6–5879
3	522.1	195	17–2658
4	136.1	43.87	30–837
5	77.59	10.3	21–285

SEM: Standard error of the mean. Group 1: patients with molecularly confirmed mitochondrial disease, Group 2: patients with definitive mitochondrial disease, Group 3: patients with probable mitochondrial disease. Group 4: patients with non-mitochondrial myopathy. Group 5: healthy controls.

doi:10.1371/journal.pone.0148709.t001

p = 0.007) but not in group 2. The remaining of the biochemical parameters analysed (including lactic acid) did not present any association with FGF-21 and GDF-15 values in any of the groups. No significant association was obtained either between FGF-21 and GDF-15 values and the age and gender of the patients.

Diagnostic performance of GDF-15 and FGF-21

We performed ROC analysis for GDF-15 and FGF-21 and obtained the area under the curve (AUC). As shown in Fig 3 both factors had a good discriminatory power when all patients were considered together or by groups.

This analysis allowed us to select a clinically useful cut-off value for either factor which would give us an adequate sensitivity and specificity. This value was set at 550pg/ml for GDF-

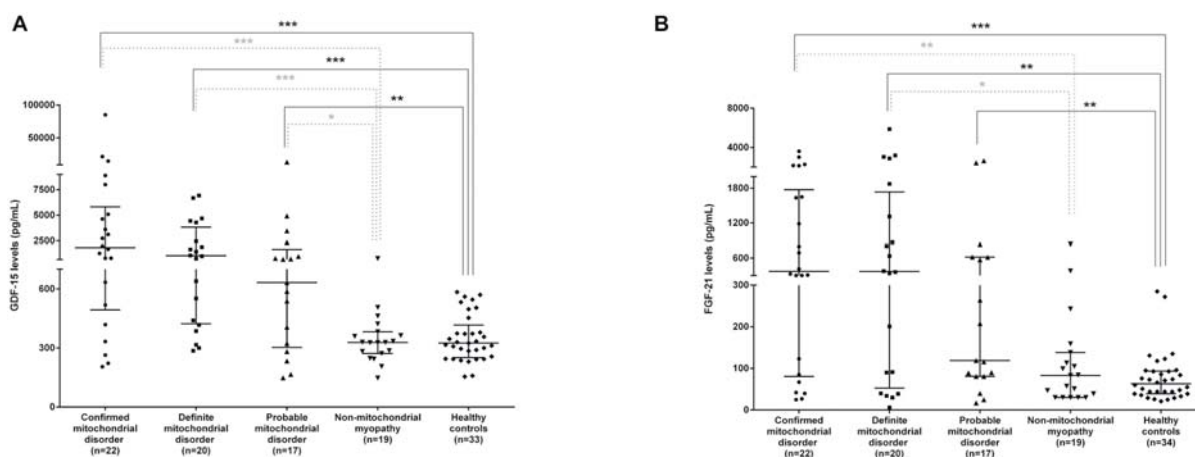


Fig 1. GDF-15 and FGF-21 circulating concentrations. Data are represented as the median +/- the interquartile range. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 (U-Mann-Whitney test).

doi:10.1371/journal.pone.0148709.g001

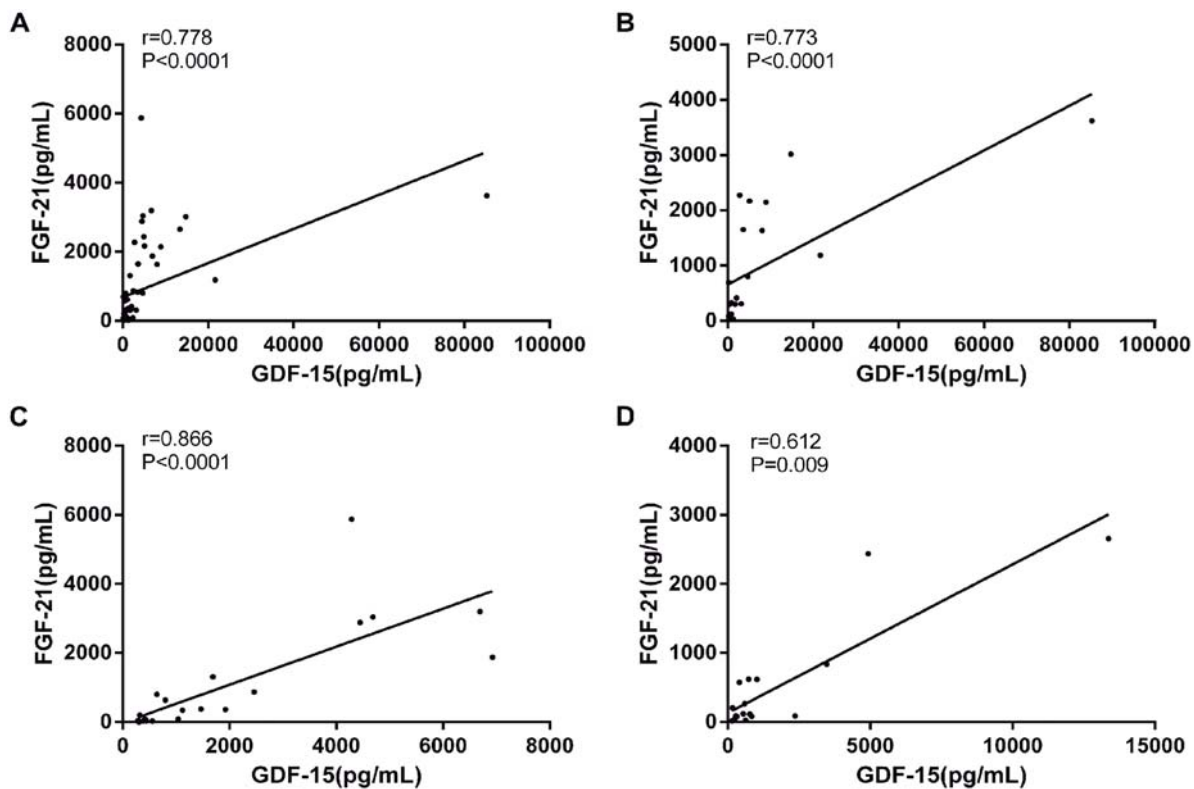


Fig 2. Correlation analysis between GDF-15 and FGF-21. serum levels in samples from all patient groups taken as a whole (A), group 1(B), group 2 (C) and group 3(D).

doi:10.1371/journal.pone.0148709.g002

15 and 300 pg/ml for FGF-21. Both values are close to the maximum value in the healthy control group for each soluble factor (see above). The sensitivity, specificity, positive (PPV) and negative (NPV) predictive values for GDF-15 and FGF-21 in each patient group are summarised in [Table 2](#).

Finally, our data indicated that the combined use of both factors increased the ability of either factor alone to correctly identify patients. The percentage of patients with both GDF-15 and FGF-21 elevated above the cut-off value was higher than the percentage of patients with either elevated GDF-15 or FGF-21 alone. In contrast, the large majority of patients without mitochondrial disease showed values within the normal limit for both factors ([Fig 4](#)).

Experimentally induced mitochondrial dysfunction increases FGF-21 expression and release in muscle cells

Considering the above data in patients, we determined whether mitochondrial dysfunction affects GDF-15 gene expression in muscle cells. To this end, we treated C2C12 myotubes with drugs that act at distinct sites of the respiratory chain/oxidative phosphorylation system. Drugs were used at concentrations that did not cause significant cytotoxicity in myotubes and caused an induction of FGF-21 gene expression and release [18]. Treatment with the ATP synthase inhibitor oligomycin (0.1 μ M) or with the complex III inhibitor antimycin A (10 μ M) for 24 h caused a dramatic induction of GDF-15 gene expression, as well as of FGF-21 gene expression ([Fig 5A](#)). In parallel experiments, the effects of oligomycin and antimycin A were determined in human LHCN-M2 myotubes. Similarly to the results obtained in mouse myogenic cells,

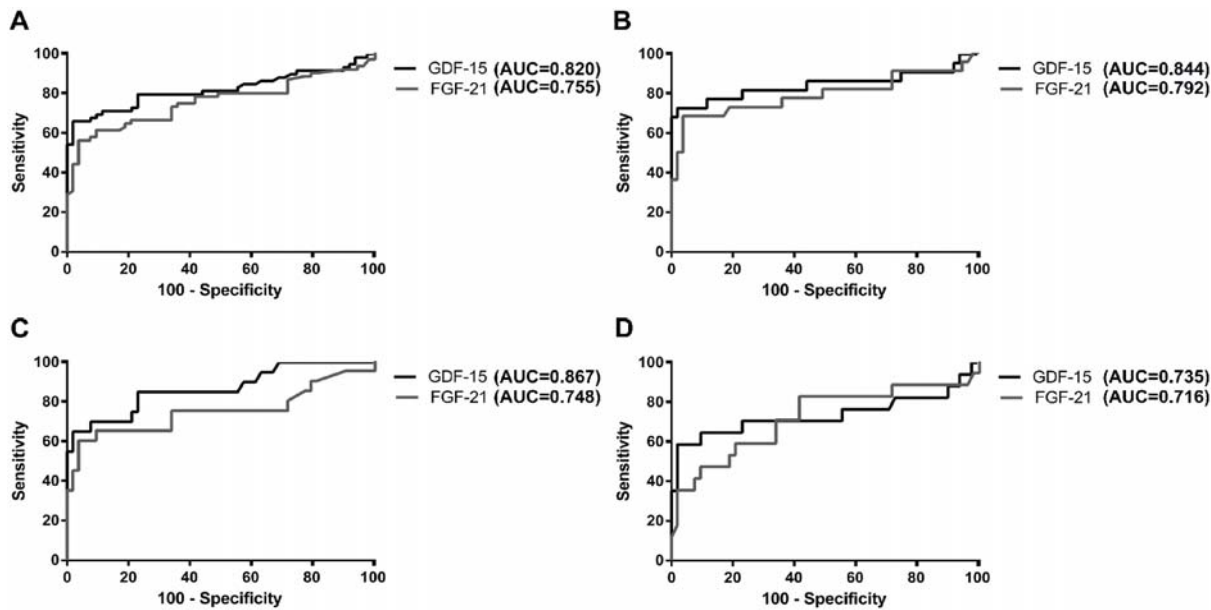


Fig 3. Receiving Operating Curve. analysis for GDF-15 and FGF-21 considering patients in groups 1, 2 and 3 together (A) or patients group 1(B), group 2 (C) and group 3(D) separately.

doi:10.1371/journal.pone.0148709.g003

oligomycin and antimycin A induced a significant increase in GDF15 mRNA expression in human LHCN-M2 myotubes, as well as of FGF21 mRNA (Fig 5B). Correlation analysis settings indicated a highly significant correlation between the extent of GDF15 mRNA expression and FGF21 mRNA expression in cells under the distinct experimental settings both in mouse and humans muscle cells (Fig 5). Treatment of C2C12 myotubes with oligomycin for 24h resulted in a marked increase in GDF15 protein levels released to the cell culture medium (Fig 5) and there was a minor but significant increase due to the treatment with antimycin (Fig 5D). As for mRNA, protein levels of FGF21 and GDF15 released to the cell culture medium in the experimental conditions tested showed a significant correlation (Fig 6). However, no significant effects on GDF15 protein accumulation were found in the LHCN-M2 cell model (data not shown).

Table 2. Diagnostic performance of GDF-15 (A) and FGF-21 (B) for a cut-off value of 550pg/ml and 300pg/ml respectively. 95% confidence intervals are indicated in brackets.

GDF-15				
Group	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
All	67.8% (54.4%–79.4%)	92.3% (81.5%–97.9%)	93% (80.9%–98.5%)	61.2% (46.2%–74.8%)
Confirmed	72.7% (49.8%–89.2%)	92.3% (81.5%–97.9%)	84.2% (60.4%–96.6%)	83.3% (67.2%–93.6%)
Definitive	70% (45.7%–88.1%)	92.3% (81.5%–97.9%)	82.3% (56.7%–96.2%)	83.3% (67.2%–93.6%)
Probable	58.8% (32.9%–81.6%)	92.3% (81.5%–97.9%)	76.9% (46.2%–94.9%)	81.1% (64.8%–92%)
FGF-21				
Group	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
All	52.5% (39.1%–65.7%)	96.2% (87%–99.5%)	100% (89.4%–100%)	56.7% (43.2%–69.4%)
Confirmed	59.1% (36.3% to 79.3%)	96.2% (87%–99.5%)	100% (78.2%–100%)	82.9% (67.9%–92.8%)
Definitive	60% (36.1%–80.9%)	96.2% (87%–99.5%)	100% (73.5%–100%)	80.9% (56.9%–91.4%)
Probable	35.3% (14.2%–61.7%)	96.2% (87%–99.5%)	100% (54.1%–100%)	75.6% (60.5%–87.1%)

doi:10.1371/journal.pone.0148709.t002

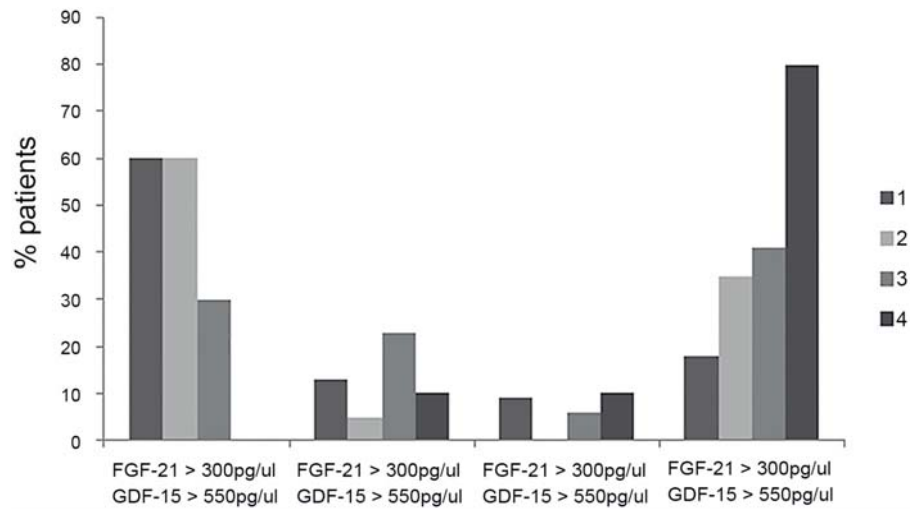


Fig 4. Histogram representing the percentage of patients in each group with both GDF-15 and FGF-21 above cut-off values, GDF-15 or FGF-21 elevated or both factors within normal values.

doi:10.1371/journal.pone.0148709.g004

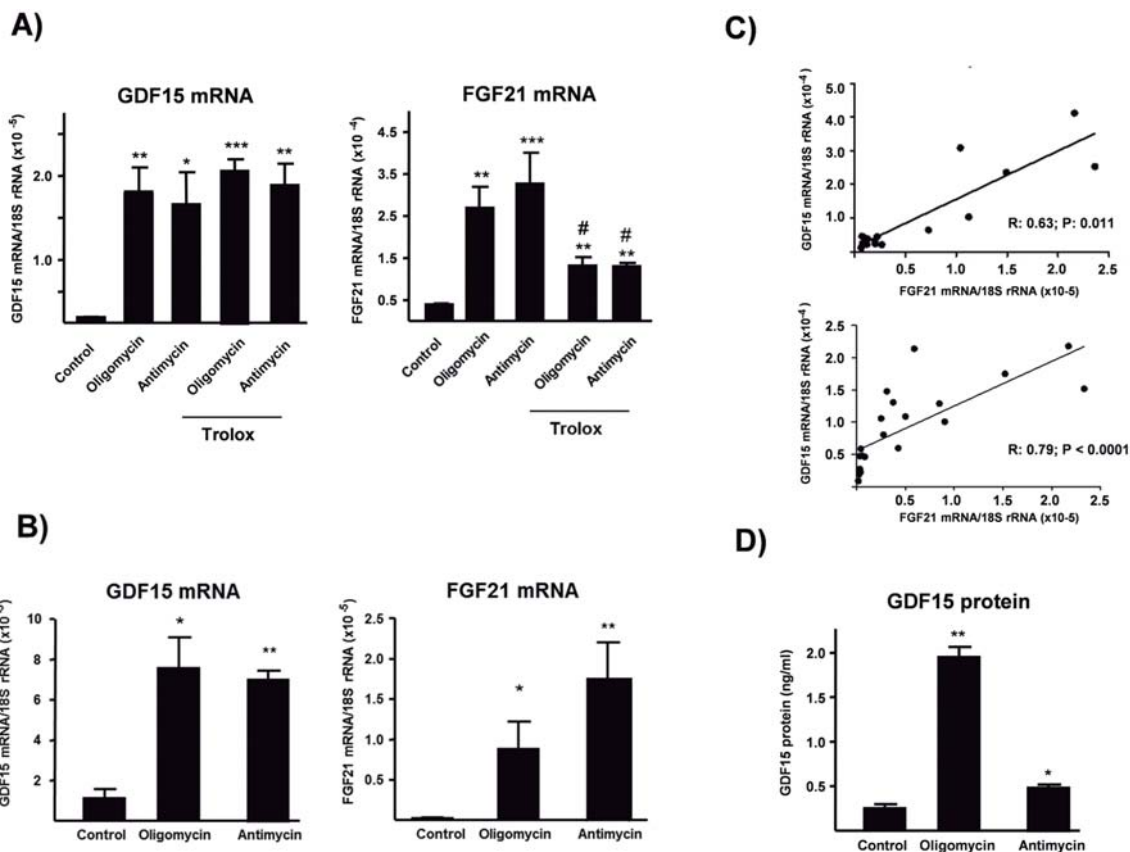


Fig 5. Effects of experimentally induced mitochondrial dysfunction on GDF-15 mRNA expression and GDF15 protein release in muscle cells. GDF15 mRNA and FGF21 mRNA levels in C2C12 myotubes (A) or LHCN myotubes (B), and correlation between GDF-15 mRNA levels and FGF21 mRNA levels (C) in the experimental settings in C2C12 cells (up) and LHCN cells (down). GDF-15 protein concentrations in C2C12 cell culture medium (D). Bars are means \pm S.E.M. from 4–6 independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, relative to untreated controls. # $p < 0.05$, relative to corresponding condition non-treated with Trolox. R and P values are shown in the correlation panel C.

doi:10.1371/journal.pone.0148709.g005

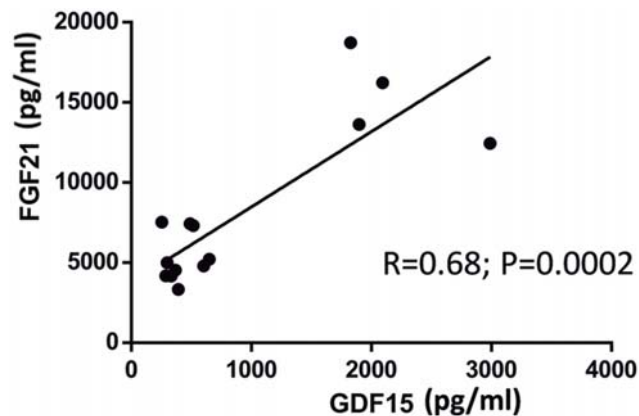


Fig 6. Correlation analysis between GDF-15 and FGF-21 protein levels. in the conditioned medium of C2C12 cells treated with respiratory chain inhibitors.

doi:10.1371/journal.pone.0148709.g006

Previous studies have shown that reactive oxygen species (ROS) production is involved in the induction of FGF21 expression by experimental mitochondrial dysfunction [18]. Effectively, treatment of myotubes with the ROS scavenger Trolox blunted oligomycin- and antimycin-induced FGF21 expression. In contrast, the induction of GDF-15 by the mitochondrial function inhibitors was insensitive to the presence of the ROS scavenger (Fig 4A). Other ROS scavengers such as ascorbic acid or N-acetyl cysteine were also unable to blunt the induction of GDF-15 expression in response to oligomycin or antimycin (data not shown). Thus, in contrast with FGF-21, intracellular mechanisms other than enhanced ROS induction account for the GDF-15 induction in response to altered mitochondrial function.

We had previously shown that GDF-15 skeletal muscle mRNA levels dramatically increased in patients with mitochondrial disease and that human myotubes constitutively secreted this cytokine [11]. To investigate the regulation of GDF-15 expression we quantified its mRNA during myogenic differentiation in C2C12 and human LHCN-M2 myogenic cells and compared it to myogenin and FGF-21 which are induced during myogenesis [18]. In contrast to myogenin and FGF-21 we did not observe an increase in GDF-15 expression between undifferentiated cells and cells, 1, 3 or 5 days post-differentiation in C2C12 cells, nor in the transition from myoblastic stage to differentiated muscle (myotube) stage in human LHCN-M2 cells (data not shown). We explored whether ER (endoplasmic reticulum stress) was involved in oligomycin- or antimycin A-induced GDF15 gene expression. Induction of ER stress by use of drugs such as tunicamycin or thapsigargin induced strongly the expression of GDF15 and FGF21, indicating the sensitivity of these genes to this pathway of cellular stress (S2 Table). However, we found no change in the expression of the ER-stress-response marker gene GRP78 following exposure of C2C12 myotubes or LHCN-M2 myotubes to oligomycin or antimycin A at the concentrations tested (S3 Table). Thus, although involvement of ER stress in the regulation of GDF15 (and FGF21) cannot be ruled out as involved in the induction of these genes in damaged muscle, mitochondrial-driven pathways of control appear to occur independently from ER stress.

Discussion

In the present study we have compared circulating GDF-15 and FGF-21 levels in a cohort consisting exclusively of children with a diagnosis of mitochondrial disease which included patients with mutations in both mitochondrial and nuclear DNA.

Just before submission Yatsuga et al. reported elevated GDF-15 levels in a group of patients (mainly adults) with mutations in mitochondrial DNA [19] (KSS, MELAS or Leigh Syndrome). Our work differs from Yatsuga and co-workers work in that we focus exclusively on children under the age of 18 (mean age 6.7 years versus 33 years) and that we have studied patients both with mutations in mitochondrial and nuclear DNA with a wide range of phenotypes. We also decided to include patients without known mutations in either nuclear or mitochondrial DNA but with established clinical and other criteria of mitochondrial disease according to Morava diagnostic score. We thought that given the clinical and genetic heterogeneity of mitochondrial diseases and the difficulty to reach a molecular diagnosis in children it would be more helpful to test GDF-15 in those patients with different degrees of suspicion than only in patients with already known molecular defects. The rationale being that if proven sensitive it would then help selecting patients for further biochemical and genetic analysis reducing the time and cost of the diagnostic work up. Lastly, we provide experimental evidence that mitochondrial dysfunction in skeletal muscle cells leads to GDF-15 induction.

Our results indicate that GDF-15 is a sensitive and specific biomarker to guide the diagnosis of this group of complex genetic diseases. Furthermore we show that the combined use of GDF-15 and FGF-21 is more efficient in identifying patients than either factor alone. This strategy would be useful for example to select patients for comprehensive genetic analysis, which is still expensive and not available in all centers.

GDF-15 has been studied before in the context of cancer, obesity, type II diabetes, malaria and heart disease [20], [21], [22], [15]. In those studies GDF-15 values in the control groups were similar to the ones we found in the present study (c.300pg/ml) in both children and adults supporting our finding that GDF-15 does not correlate with age.

In the present study, GDF-15 average circulating concentration in mitochondrial patients was similar to our previous data [11] and other recent publications [19][23].

Amongst patients with the highest levels of GDF-15 were children with mutations in *TK2*, patients with MELAS and the common mutations in the *MT-TL1* gene and patients with deletions in mtDNA including one patient with Pearson Syndrome and two patients with KSS. Out of patients with KSS the one with kidney involvement (P25) had the higher levels of GDF-15 (and FGF-21) suggesting that kidney may be an important source of both factors. In fact, GDF-15 is expressed in the collecting ducts in the kidney [24] and there are publications that associate GDF-15 with kidney dysfunction in mice [12] and in some pathologies such as diabetic nephropathy [25] and in patients undergoing coronary artery bypass grafting [26]. It is worth noting that patients with multisystemic mitochondrial disease with kidney and or CNS involvement had markedly elevated levels of GDF-15 (P19, P39 and P41).

GDF-15 is expressed in the brain where it is produced and secreted into the CSF by the choroid plexus cells [16]. Thus, it would be interesting to investigate GDF-15 concentrations in CSF.

Five patients with mutations in mtDNA or nuclear DNA showed GDF-15 values below the cut-off value of 550pg/ml. Four of these also had normal FGF-21 concentrations. These were patients with a mainly neurological presentation including 2 patients with PDHA1 deficiency, a patient with a severe encephalopathy and mutations in the *GFMI* gene [27], a patient with NARP (neuropathy, ataxia and retinitis pigmentosa) and a patient with mutations in *OPA1*. The reason of these normal values is unclear and requires further investigation, but it may be explained, in the case of mitochondrial DNA mutations, because of the phenomenon of heteroplasmy, or in the case of nuclear DNA mutations, by the tissue specificity of the phenotype.

Regarding FGF-21 patients with values within the normal range have already been described [10]. Amongst patients with genetically confirmed mitochondrial disease (group 1) we found 3 who had normal levels of FGF-21 but elevated GDF-15 and they all had the common MELAS

mutation. Thus, GDF-15 may be particularly helpful in this group of patients. Two of them (P10 and P11) are two sisters from a family with several affected members with MELAS [28]. P10 has migraines as the only symptom and P11 is currently asymptomatic. Thus, GDF-15 may be able to detect early symptoms and sub-clinical presentations although in a recent report GDF-15 did not correlate with disease progression in adults bearing the m.A3243>G mutation [29].

Some patients had more than one sample re-tested at different time points. In those patients levels of GDF-15 tended to increase with time or remained unchanged. For example, in P8 with mutations in *TK2* and a severely progressive clinical course, GDF-15 levels increased by 1.5 fold in a 6 months period. This patient was started on nucleotide replacement therapy [30] and a third serum sample taken 7 months after start of treatment showed an important decrease in GDF-15 levels. We are currently investigating more patients with mutations in *TK2* under treatment. These data suggest that GDF-15 may be useful to monitor disease progression and response to treatment in mitochondrial myopathies.

GDF-15 AUC values were slightly higher than those for FGF-21, consistent with recent reports. All groups presented high AUC values (above 0.8) confirming that GDF-15 is able to discriminate properly between a patient and a healthy individual. In our study, however the AUC for GDF-15 and FGF-21 were lower than reported previously [10],[19]. This may be due to the fact that our patient cohort is more heterogeneous than in the above mentioned studies and to the sample size of each sub-group. We believe however that it was important to study patients with a reasonable diagnostic criteria of mitochondrial disease (according to clinical, pathological, radiological and biochemical parameters) even if genetic confirmation was pending because this situation is closer to daily clinical practice. In this way we were able to assess whether GDF-15 was useful to help clinicians to prioritize patients for further genetic analysis and or muscle biopsy.

We did not find significant correlations between GDF-15 and FGF-21 and other metabolites including lactate and pyruvate. In fact, in all patient groups we found that a proportion of patients (between 16% and 29% depending on the group) had normal lactate levels but both GDF-15 and FGF-21 elevated. This suggests that these factors are more sensitive than lactate. We did not find any positive associations either between GDF-15 or FGF-21 levels and involvement of skeletal muscle, CNS, heart or kidney (S1 Table).

The induction of GDF-15 by mitochondrial respiratory chain inhibitors in myogenic cells that we have observed in the present study indicates that, similarly to FGF21, disturbing mitochondrial function is a powerful stimulus for the expression and release of both factors. This observation provides a strong mechanistic support to the common induction of GDF-15 and FGF21 levels in patients. For FGF21, reactive oxygen species production by mitochondria play a main role in the induction of FGF21 gene expression, and anti-oxidants can block it. In contrast, anti-oxidants are unable to block the GDF-15 induction elicited by mitochondrial inhibitors. These findings do not rule out the involvement of oxidative stress in the regulation of GDF15 gene in some cell types or under distinct challenges [15] but indicate that the intracellular mechanisms of “mitochondrial retrograde signaling” to the FGF21 and GDF15 genes are distinct and, for GDF15 may involve processes other than ROS production in muscle mitochondria such as ER stress [31]. However, despite we found that ER stress signaling could induce GDF15 in myotubes, the fact that mitochondrial-driven drugs at the concentrations used induce GDF15 expression but not marker genes of ER stress, suggest the existence of additional, mitochondria dependent, pathways of GDF15 gene regulation.

To summarise, in the present study we have shown that GDF-15 is a valuable diagnostic marker to aid in the diagnostic work-up of children with a suspicion of mitochondrial disease. The combined analysis of GDF-15 and FGF-21 allows for a more guided selection of patients for further biochemical and genetic analysis. GDF-15 (and FGF-21) may also be applied as

surrogate markers to monitor the progression of these diseases or the effect of a treatment. Further studies are necessary to understand the mechanisms regulating GDF-15 under conditions of mitochondrial dysfunction and cellular stress.

Supporting Information

S1 Table. Summary of patients characteristics and GDF-15 and FGF-21 concentrations.
(DOCX)

S2 Table. Effects of tunicamycin and thapsigargin on GDF-15 and FGF21 mRNA expression in differentiated myotubes.
(DOCX)

S3 Table. Effects of oligomycin, antimycin A, tunicamycin and thapsigargin on GPR78 mRNA expression in differentiated myotubes.
(DOCX)

Acknowledgments

Muscle biopsy of the patient IM and serum of the patients KM, IM, IA were obtained from Neuromuscular tissue bank of the University of Ljubljana, Slovenia (<http://www.eurobiobank.org/>). Clinical data for the patients KM, IM, IA were collected by M. Meznaric. Muscle biopsy of the patient IM was analysed at the University of Ljubljana and muscle biopsy of the patient KM at the Neurological Institute “Casimiro Mondino”, Pavia, Italy. Respiratory chain analysis was performed for the patient IM at the National Neurological Institute “C. Besta”, Milan, Italy and for the patient KM at the Neurological Institute “Casimiro Mondino”, Pavia, Italy. Genetic analyses were performed for IM and IA at the National Neurological Institute “C. Besta”, Milan, Italy and for the patient KM at the St. Johanns-Spital, Salzburg, Austria. We are grateful to the “Biobanc de l’Hospital Infantil Sant Joan de Déu per a la Investigació” integrated in the Spanish Biobank Network of ISCIII for the sample and data procurement. We are indebted to the Bioinformatics Core Facility of the IDIBAPS for the use of its software resources.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: RM AN JM FV RA SGK CJM. Performed the experiments: RM DY JV DH MAR LC CJM SE ERP. Analyzed the data: RM RA JV DH CJ FR CIO JC BPD MO MP AGC JCO JM ERP SE MM LC. Contributed reagents/materials/analysis tools: AN CIO JC BPD MO MP AGC JCO MM. Wrote the paper: RM RA DY DH FR AN BPD MO JM MM SGK FV RA CJM.

References

1. DiMauro S, Schon EA, Carelli V, Hirano M. The clinical maze of mitochondrial neurology. *Nat Rev Neurol.* 2013; 9: 429–44. doi: [10.1038/nrneurol.2013.126](https://doi.org/10.1038/nrneurol.2013.126) PMID: [23835535](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23835535/)
2. Tulinius M, Oldfors A. Neonatal muscular manifestations in mitochondrial disorders. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2011; 16: 229–35. doi: [10.1016/j.siny.2011.04.001](https://doi.org/10.1016/j.siny.2011.04.001) PMID: [21596636](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21596636/)
3. Bernier FP, Boneh A, Dennett X, Chow CW, Cleary MA, Thorburn DR. Diagnostic criteria for respiratory chain disorders in adults and children. *Neurology.* 2002; 59: 1406–11. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12427892> PMID: [12427892](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12427892/)
4. Morava E, van den Heuvel L, Hol F, de Vries MC, Hogeveen M, Rodenburg RJ, et al. Mitochondrial disease criteria: diagnostic applications in children. *Neurology.* 2006; 67: 1823–6. doi: [10.1212/01.wnl.0000244435.27645.54](https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000244435.27645.54) PMID: [17130416](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17130416/)

5. Haas RH, Parikh S, Falk MJ, Saneto RP, Wolf NI, Darin N, et al. The in-depth evaluation of suspected mitochondrial disease. *Mol Genet Metab*. 2008; 94: 16–37. doi: [10.1016/j.ymgme.2007.11.018](https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2007.11.018) PMID: [18243024](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18243024/)
6. Vasta V, Ng SB, Turner EH, Shendure J, Hahn SH. Next generation sequence analysis for mitochondrial disorders. *Genome Med*. 2009; 1: 100. doi: [10.1186/gm100](https://doi.org/10.1186/gm100) PMID: [19852779](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19852779/)
7. Chi C-S. Diagnostic Approach in Infants and Children with Mitochondrial Diseases. *Pediatr Neonatol*. 2015; 56: 7–18. doi: [10.1016/j.pedneo.2014.03.009](https://doi.org/10.1016/j.pedneo.2014.03.009) PMID: [25151629](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25151629/)
8. Rodenburg RJT. Biochemical diagnosis of mitochondrial disorders. *J Inher Metab Dis*. 2011; 34: 283–92. doi: [10.1007/s10545-010-9081-y](https://doi.org/10.1007/s10545-010-9081-y) PMID: [20440652](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20440652/)
9. Liang C, Ahmad K, Sue CM. The broadening spectrum of mitochondrial disease: shifts in the diagnostic paradigm. *Biochim Biophys Acta*. 2014; 1840: 1360–7. doi: [10.1016/j.bbagen.2013.10.040](https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.10.040) PMID: [24239706](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24239706/)
10. Suomalainen A, Elo JM, Pietilainen KH, Hakonen AH, Sevastianova K, Korpela M, et al. FGF-21 as a biomarker for muscle-manifesting mitochondrial respiratory chain deficiencies: a diagnostic study. *Lancet Neurol. Research Programmes Unit, Molecular Neurology, University of Helsinki, Helsinki, Finland*. anu.wartiovaara@helsinki.fi; Elsevier Ltd; 2011; 10: 806–818. doi: [10.1016/S1474-4422\(11\)70155-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(11)70155-7) PMID: [21820356](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21820356/)
11. Kalko SG, Paco S, Jou C, Rodríguez MA, Meznaric M, Rogac M, et al. Transcriptomic profiling of TK2 deficient human skeletal muscle suggests a role for the p53 signalling pathway and identifies growth and differentiation factor-15 as a potential novel biomarker for mitochondrial myopathies. *BMC Genomics*. 2014; 15: 91. doi: [10.1186/1471-2164-15-91](https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-91) PMID: [24484525](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24484525/)
12. Zimmers TA, Jin X, Hsiao EC, McGrath SA, Esquela AF, Koniaris LG. Growth differentiation factor-15/macrophage inhibitory cytokine-1 induction after kidney and lung injury. *Shock*. 2005; 23: 543–8. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15897808> PMID: [15897808](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15897808/)
13. Zimmers TA, Jin X, Hsiao EC, Perez EA, Pierce RH, Chavin KD, et al. Growth differentiation factor-15: induction in liver injury through p53 and tumor necrosis factor-independent mechanisms. *J Surg Res*. 2006; 130: 45–51. doi: [10.1016/j.jss.2005.07.036](https://doi.org/10.1016/j.jss.2005.07.036) PMID: [16154591](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16154591/)
14. Strelau J, Böttner M, Lingor P, Suter-Crazzolara C, Galter D, Jaszai J, et al. GDF-15/MIC-1 a novel member of the TGF-beta superfamily. *J Neural Transm Suppl*. 2000; 273–6. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11205146>
15. Dominguez-Rodríguez A, Abreu-Gonzalez P, Avanzas P. Relation of growth-differentiation factor 15 to left ventricular remodeling in ST-segment elevation myocardial infarction. *Am J Cardiol*. Department of Cardiology, Hospital Universitario de Canarias, Tenerife, Spain. drvvg@hotmail.com; Elsevier Inc; 2011; 108: 955–958. doi: [10.1016/j.amjcard.2011.05.028](https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2011.05.028) PMID: [21784389](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21784389/)
16. Strelau J, Strzelczyk A, Rusu P, Bendner G, Wiese S, Diella F, et al. Progressive postnatal motoneuron loss in mice lacking GDF-15. *J Neurosci*. 2009; 29: 13640–8. doi: [10.1523/JNEUROSCI.1133-09.2009](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1133-09.2009) PMID: [19864576](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19864576/)
17. Yubero D, O'Callaghan M, Montero R, Ormazabal A, Armstrong J, Espinos C, et al. Association between coenzyme Q10 and glucose transporter (GLUT1) deficiency. *BMC Pediatr*. 2014; 14: 284. doi: [10.1186/s12887-014-0284-5](https://doi.org/10.1186/s12887-014-0284-5) PMID: [25381171](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25381171/)
18. Ribas F, Villarroya J, Hondares E, Giralt M, Villarroya F. FGF21 expression and release in muscle cells: involvement of MyoD and regulation by mitochondria-driven signalling. *Biochem J*. 2014; 463: 191–9. doi: [10.1042/BJ20140403](https://doi.org/10.1042/BJ20140403) PMID: [25055037](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25055037/)
19. Yatsuga S, Fujita Y, Ishii A, Fukumoto Y, Arahata H, Kakuma T, et al. Growth differentiation factor 15 as a useful biomarker for mitochondrial disorders. *Ann Neurol*. 2015; doi: [10.1002/ana.24506](https://doi.org/10.1002/ana.24506)
20. Roth P, Junker M, Tritschler I, Mittelbronn M, Dombrowski Y, Breit SN, et al. GDF-15 contributes to proliferation and immune escape of malignant gliomas. *Clin Cancer Res*. Laboratory of Molecular Neurooncology, Department of Neurology, University Hospital Zurich, Frauenklinikstrasse 26, Zurich, Switzerland. patrick.roth@usz.ch; AACR; 2010; 16: 3851–3859. doi: [10.1158/1078-0432.CCR-10-0705](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-0705) PMID: [20534737](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20534737/)
21. De Mast Q, Syafruddin D, Keijmel S, Riekerink TO, Deky O, Asih PB, et al. Increased serum hepcidin and alterations in blood iron parameters associated with asymptomatic *P. falciparum* and *P. vivax* malaria. *Haematologica*. Department of Internal Medicine, Radboud University Medical Center PO Box 9101, 6500 HB, Nijmegen, the Netherlands. q.demast@aig.umcn.nl; 2010; 95: 1068–1074. doi: [10.3324/haematol.2009.019331](https://doi.org/10.3324/haematol.2009.019331) PMID: [20133896](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20133896/)
22. Dostálová I, Roubíček T, Bártlová M, Mráz M, Lacinová Z, Haluzíková D, et al. Increased serum concentrations of macrophage inhibitory cytokine-1 in patients with obesity and type 2 diabetes mellitus: the influence of very low calorie diet. *Eur J Endocrinol*. 2009; 161: 397–404. doi: [10.1530/EJE-09-0417](https://doi.org/10.1530/EJE-09-0417) PMID: [19515791](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19515791/)

23. Fujita Y, Ito M, Kojima T, Yatsuga S, Koga Y, Tanaka M. GDF15 is a novel biomarker to evaluate efficacy of pyruvate therapy for mitochondrial diseases. *Mitochondrion*. 2015; 20: 34–42. doi: [10.1016/j.mito.2014.10.006](https://doi.org/10.1016/j.mito.2014.10.006) PMID: [25446397](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25446397/)
24. Böttner M, Suter-Crazzolara C, Schober A, Unsicker K. Expression of a novel member of the TGF-beta superfamily, growth/differentiation factor-15/macrophage-inhibiting cytokine-1 (GDF-15/MIC-1) in adult rat tissues. *Cell Tissue Res*. 1999; 297: 103–10. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10398887> PMID: [10398887](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10398887/)
25. Lajer M, Jorsal A, Tarnow L, Parving H-H, Rossing P. Plasma growth differentiation factor-15 independently predicts all-cause and cardiovascular mortality as well as deterioration of kidney function in type 1 diabetic patients with nephropathy. *Diabetes Care*. 2010; 33: 1567–72. doi: [10.2337/dc09-2174](https://doi.org/10.2337/dc09-2174) PMID: [20357380](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20357380/)
26. Kahli A, Guenancia C, Zeller M, Grosjean S, Stamboul K, Rochette L, et al. Growth differentiation factor-15 (GDF-15) levels are associated with cardiac and renal injury in patients undergoing coronary artery bypass grafting with cardiopulmonary bypass. *PLoS One*. 2014; 9: e105759. doi: [10.1371/journal.pone.0105759](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105759) PMID: [25171167](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25171167/)
27. Brito S, Thompson K, Campistol J, Colomer J, Hardy SA, He L, et al. Long-term survival in a child with severe encephalopathy, multiple respiratory chain deficiency and GFM1 mutations. *Front Genet*. 2015; 6: 102. doi: [10.3389/fgene.2015.00102](https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00102) PMID: [25852744](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25852744/)
28. O'Callaghan MM, Emperador S, Pineda M, López-Gallardo E, Montero R, Yubero D, et al. Mutation loads in different tissues from six pathogenic mtDNA point mutations. *Mitochondrion*. 2015; 22: 17–22. doi: [10.1016/j.mito.2015.03.001](https://doi.org/10.1016/j.mito.2015.03.001) PMID: [25765153](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25765153/)
29. Koene S, de Laat P, van Tienoven DH, Weijers G, Vriens D, Sweep FCGJ, et al. Serum GDF15 Levels Correlate to Mitochondrial Disease Severity and Myocardial Strain, but Not to Disease Progression in Adult m.3243A>G Carriers. *JIMD Rep*. 2015; doi: [10.1007/8904_2015_436](https://doi.org/10.1007/8904_2015_436)
30. Garone C, Garcia-Diaz B, Emmanuele V, Lopez LC, Tadesse S, Akman HO, et al. Deoxypyrimidine monophosphate bypass therapy for thymidine kinase 2 deficiency. *EMBO Mol Med*. 2014; 6: 1016–27. doi: [10.15252/emmm.201404092](https://doi.org/10.15252/emmm.201404092) PMID: [24968719](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24968719/)
31. Park S-H, Choi HJ, Yang H, Do KH, Kim J, Kim H-H, et al. Two in-and-out modulation strategies for endoplasmic reticulum stress-linked gene expression of pro-apoptotic macrophage-inhibitory cytokine 1. *J Biol Chem*. 2012; 287: 19841–55. doi: [10.1074/jbc.M111.330639](https://doi.org/10.1074/jbc.M111.330639) PMID: [22511768](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22511768/)

Supp. Table 1: Patients characteristics and GDF-15 and FGF-21 concentrations												
	Age at onset	Age at sampling	Diagnosis	Skm	CNS	Heart	Liver	Kidney	DNA diagnosis	GDF-15 (pg/ml)	FGF21 (pg/mL)	
												Genetically Confirmed Mitochondrial Disease
P1	4 y	13y4m 14y10m	MELAS	Yes	No	Yes	No	No	m.3243A>G (tRNA ^{Leu(UUR)}) (75% muscle, 75% urine, 10% buccal mucose)	4626 8898	800 2146	
P2	12 m	1y10m 3y6m 4y5m	Pearson Syndrome	No	No	No	No	No	m.10600_14603del4004 (90% muscle)	1721 3609 2740	302 1650 2274	
P3	7 y	10y	MELAS	Yes	Yes	ND	ND	ND	m.3243A>G (tRNA ^{Leu(UUR)})	1308	25	
P4	2 y	7y	MDS (TK2)	Yes	No	ND	ND	ND	TK2: c.[542C>T];[542C>T], p.[(A181V)];[(A181V)]	3114	311	
P5	2 y	2y	MDS (TK2)	Yes	No	ND	ND	ND	TK2: c.[542C>T];[542C>T], p.[(A181V)];[(A181V)]	8000	1636	
P6	10 y	13y	PEC	Yes	No	No	No	No	m.8483_13459del4977 (50% muscle, 65% urine)	841	329	
P7	6 y	15y	POLG1 Deficiency	Yes	Yes	No	Yes	No	POLG: c.[911T>G];[911T>G], p.[(Leu304Arg)];[(Leu304Arg)]	85252	3623	
P8	16 m	1y9m 2y3m 3y2m	MDS (TK2)	Yes	No	No	No	No	TK2: c.[623A>G];[388C>T], p.[(Tyr208Cys)];[(Arg130Trp)] (mtDNA 85% depletion muscle)	14756 21648 5093	3017 1186 2169	
P9	Neonatal	3y9m 4y10m	GFM1 Deficiency	No	Yes	No	No	No	GFM1: c.[104delA];[2011C>T], p.[(Ser467fs)];[(Arg671Cys)]	518-419	40 302	
P10	ND	11y	MELAS	No	Yes	No	No	No	m.3243A>G (tRNA ^{Leu(UUR)}) (3% blood, 75% urine, 31% buccal mucose)	634	67	
P11	ND	9y	MELAS	No	No	No	No	No	m.3243A>G (tRNA ^{Leu(UUR)}) (47% blood, <5% urine, 32% buccal mucose)	829	123	
P12	Neonatal	5 y	OPA1 Deficiency	No	Yes	ND	No	No	OPA1: c.[1710T>G], p.[(Phe570Leu)]	333	27	
P13	2 y	16y	PDH Deficiency	Yes	Yes	No	No	No	PDHA1: c.[1143-1144ins24]	222	85	
P14	18 m	5y	PDH Deficiency	Yes	Yes	No	No	No	PDHA1: c.[787C>G], p.[(Arg263Gly)]	205	695	
P15	15 m	7y	NARP	Yes	Yes	ND	No	No	m.9176T>C (ATPase 6) (99,5% blood, 99% buccal mucose, 99,5% urine)	264	42	
P16	14 m	3y	MDS (TK2)	Yes	No	No	No	No	TK2: c.[360_361del(GCinsAA)];c.[575G>A], p.[(His121Asn)];[(Arg192Lys)]	2011	415	
Definitive Mitochondrial Disease												

P17	Neonatal	3y	Mitochondrial Encephalomyopathy	Yes	Yes	No	No	No	ND	552	30
P18	9 m	3y	Mitochondrial Encephalomyopathy	Yes	Yes	No	No	No	ND	639	806
P19	13 m	3y - 6y	Multisystem Mitochondrial Failure	No	Yes	No	No	Yes	ND	6689 4286	5879 3196
P20	Neonatal	4y 4y11m	Mitochondrial Encephalopathy	No	Yes	No	No	No	ND	1039 797	91 638
P21	Neonatal	1m	Multisystem Mitochondrial Failure	No	Yes	No	No	No	ND	1686	1312
P22	8 m	3y7m 3y10m	Mitochondrial Encephalopathy	Yes	Yes	No	ND	No	ND	1117 1464	341 379
P23	3 y	12y	Leigh Syndrome	No	Yes	No	No	No	ND	417	90
P24	Neonatal	14y 17y	Barth Syndrome	ND	ND	ND	ND	ND	ND	4446 4685	2884 3043
P25	9 y	16y	Kearn Sayre Syndrome	Yes	Yes	No	No	Yes	ND	6926	1876
P26	Neonatal	4y	Mitochondrial Encephalopathy	Yes	Yes	No	No	No	ND	316	201
P27	3 y	8y7m 9y4m	Leigh Syndrome	Yes	Yes	No	No	No	ND	300 386	6 39
P28	Neonatal	1y	Mitochondrial Encephalopathy	No	Yes	No	No	No	ND	440	34
P29	Neonatal	10m	Leigh Syndrome	Yes	Yes	Yes	No	No	ND	1923	362
P30	6 y	11y	Kearn Sayre Syndrome	Yes	Yes	Yes	No	No	ND	2462	869
P31	Neonatal	4y	Mitochondrial Encephalomyopathy	Yes	Yes	ND	No	No	ND	286	40
Probable Mitochondrial Disease											

P32	Neonatal	3 y	Mitochondrial Encephalopathy	No	Yes	ND	No	No	ND	No	ND	632	25
P33	19 m	4 y	Mitochondrial Encephalomyopathy	Yes	Yes	No	No	No	No	No	ND	539	119
P34	Neonatal	15 y	Multisystem Mitochondrial Failure	Yes	Yes	No	No	No	No	No	ND	323	81
P35	Neonatal	13y11m 14y5m	Mitochondrial Encephalopathy	Yes	Yes	No	No	No	No	No	ND	406 733	574 621
P36	Neonatal	10m	Mitochondrial Encephalopathy	No	Yes	No	No	No	No	No	ND	834	81
P37	6 y	16y	Mitochondrial Encephalopathy	No	Yes	ND	No	No	No	No	ND	282	90
P38	2 y	13y	Multisystem Mitochondrial Failure	No	Yes	No	No	No	No	Yes	ND	166	208
P39	Neonatal	12y	Multisystem Mitochondrial Failure	No	Yes	No	No	No	No	No	ND	13370	2658
P40	Neonatal	1m	Mitochondrial Encephalopathy	No	Yes	No	No	No	No	No	ND	771	116
P41	15m	3y	Mitochondrial Nephropathy	No	No	No	No	No	No	Yes	ND	4931	2438
P42	Neonatal	4y	Multisystem Mitochondrial Failure	No	No	No	No	No	No	No	ND	2277	124
P43	3 m	4m	Multisystem Mitochondrial Failure	No	Yes	No	No	No	No	No	ND	1019	618
P44	8 m	2y	Mitochondrial Nephropathy	No	No	No	No	No	No	Yes	ND	2361	89
P45	20 m	7y	Mitochondrial Encephalopathy	No	Yes	No	No	No	No	No	ND	234	40

P46	Neonatal	1y	Mitochondrial Encephalomyopathy	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3475	837
P47	Neonatal	10m	Mitochondrial Encephalopathy	No	Yes	No	No	No	ND	ND	588	264
P48	18 m	5y	Mitochondrial Encephalopathy	Yes	No	No	No	No	ND	ND	149	17
Non-mitochondrial Myopathy												
P49	Neonatal	11y	UCMD	Yes	No	No	No	No	No	No	327	243
P50	Neonatal	8y	UCMD	Yes	No	No	No	No	No	No	334	837
P51	Neonatal	6y	UCMD	Yes	No	No	No	No	No	No	147	99
P52	Neonatal	5y	UCMD	Yes	No	No	No	No	ND	ND	359	30
P53	Neonatal	6y	UCMD	Yes	No	No	No	No	COL6A1: c.[868 G>A], p. [(Gly290Arg)]	COL6A1: c. [717+4A>G], p. [(271Arg>X)]	327	113
P54	Neonatal	19y	UCMD	Yes	No	No	No	No	COL6A1 (details not available)	COL6A1: c. [877G>A], p. [(Gly293Arg)]	506	159
P55	Neonatal	16y	UCMD	Yes	No	No	No	No	COL6A1 (details not available)	COL6A1: c. [877G>A], p. [(Gly293Arg)]	247	105
P56	Neonatal	8y	UCMD	Yes	No	No	No	No	COL6A1: c.[877G>A], p. [(Gly293Arg)]	COL6A1: c. [717+4A>G], p. [(271Arg>X)]	272	138
P57	9y	17y	BM	Yes	No	No	No	No	COL6A1: c.[877G>A], p. [(Gly293Arg)]	COL6A1: c. [717+4A>G], p. [(271Arg>X)]	206	84
P58	5y	8y	BMD	Yes	No	No	No	No	DMD: c.[3850C>T], p. [(1284Glu>X)]	DMD: c. [3578T>A], p. [(1193Leu>X)]	382	57
P59	3y	5y	DMD	Yes	Yes	Yes	No	No	DMD: c.[3578T>A], p. [(1193Leu>X)]	DMD: c. [3578T>A], p. [(1193Leu>X)]	329	39
P60	3y	4y	DMD	Yes	Yes	No	No	No	DMD (details NA)	DMD (details NA)	422	30
P61	3y	4y	DMD	Yes	Yes	Yes	No	No	DMD: c.[2733insG], p. [925	DMD: c.[2733insG], p. [925	282	30
P62	3y	12y	DMD	Yes	Yes	No	No	No	DMD (details NA)	DMD (details NA)	363	83
P63	3y	3y	DMD	Yes	No	No	No	No	DMD (details NA)	DMD (details NA)	244	47
P64	3y	6y	DMD	Yes	Yes	No	No	No	DMD: c.[583C>T], p. [(195Arg>X)]	DMD: c.[583C>T], p. [(195Arg>X)]	286	380
P65	3 y	8y	DMD	Yes	Yes	Yes	No	No	DMD (details NA)	DMD (details NA)	328	30
P66	Neonatal	1y	CM with cores	Yes	No	No	No	No	ND	ND	462	51
P67	Neonatal	1y	CMD	Yes	No	Yes	No	No	LMNA: c[745C>T],p. [(249Arg>Trp)]	LMNA: c[745C>T],p. [(249Arg>Trp)]	809	30

Neonatal: within 1st month of life; NA= not available; ND= not determined; y=years; m=months; Skm=skeletal muscle; DMD=Duchenne Muscular Dystrophy; BMD= Becker Muscular Dystrophy; UCMD: Ullrich Congenital Muscular Dystrophy; BM: Bethlem Myopathy; CM: congenital Myopathy; CMD: Congenital Muscular Dystrophy

S2 Table. Effects of tunicamycin and thapsigargin on GDF-15 and FGF21 mRNA expression in differentiated myotubes.

	FGF21 mRNA (fold- induction vs controls)	GDF15 mRNA (fold- induction vs controls)
C2C12 myotubes:		
Tunicamycin (1 μ M)	18 \pm 1***	22 \pm 4 ***
Thapsigargin (1 μ M)	25 \pm 4***	21 \pm 2***
LHCN-M2 myotubes:		
Tunicamycin (1 μ M)	78 \pm 3***	10 \pm 1 ***
Thapsigargin (1 μ M)	99 \pm 6***	11 \pm 1***

Differentiated myotubes were treated with drugs during 24h. Data are means \pm SEM of three independent experiments. ***P < 0.001 in comparison with control, untreated, cells.

S3 Table. Effects of oligomycin, antimycin A, tunicamycin and thapsigargin on GPR78 mRNA expression in differentiated myotubes.

	GPR28 mRNA (fold- induction vs controls)
<hr/>	
C2C12 myotubes:	
Oligomycin (0.1 μ M)	1.3 \pm 0.2 NS
Antimycin A (10 μ M)	1.4 \pm 0.4 NS
Tunicamycin (1 μ M)	18 \pm 2***
Thapsigargin (1 μ M)	22 \pm 2***
LHCN-M2 myotubes:	
Oligomycin (0.1 μ M)	1.2 \pm 0.3 NS
Antimycin A (10 μ M)	1.7 \pm 0.4 NS
Tunicamycin (1 μ M)	36 \pm 3***
Thapsigargin (1 μ M)	41 \pm 2***

Differentiated myotubes were treated with drugs during 24h. Data are means + SEM of three independent experiments. ***P < 0.001 in comparison with control, untreated, cells; NS, non significant.

