

DISCUSIÓN GLOBAL

V. DISCUSIÓN GLOBAL

Los resultados presentados en este trabajo se engloban en tres grandes bloques de estudio: La implicación del adipocito marrón en la lipomatosis inducida por la terapia antiretroviral, el estudio de nuevos factores reguladores de la función mitocondrial en el adipocito marrón y el efecto de los fármacos antiretrovirales en adipocitos en cultivo.

IMPLICACIÓN DEL ADIPOCITO MARRÓN EN LA LIPOMATOSIS INDUCIDA POR LA TERAPIA HAART

La terapia antiretroviral de elevada actividad (HAART) que se utiliza actualmente para el tratamiento del VIH ha conseguido reducir considerablemente la mortalidad y morbilidad asociada a la enfermedad del SIDA (Palella, Jr. et al., 1998). Los fármacos antiretrovirales que se utilizan pertenecen a tres grupos: inhibidores de la transcriptasa reversa análogos de nucleósidos (NRTIs), inhibidores de la transcriptasa reversa no-análogos de nucleósidos (NNRTIs) y inhibidores de la proteasa del virus (PIs). La combinación de estos fármacos en pacientes de SIDA resulta realmente eficaz, pero en los últimos años se ha descrito un importante efecto secundario de estos fármacos denominado síndrome de lipodistrofia asociada a HAART. Este síndrome se caracteriza por alteraciones región-específicas de la distribución de la grasa corporal y alteraciones metabólicas asociadas, como hipertriglicémia, hipercolesteronemia y resistencia a la insulina (Carr and Cooper, 2000; Periard et al., 1999).

Entre un 5-10% de los pacientes de SIDA con lipodistrofia desarrollan lipomatosis, generalmente caracterizadas por acumulaciones de grasa en la zona cervical, comúnmente denominadas gibas de búfalo (buffalo humps) (Lo et al., 1998).

Tanto la etiopatología de la lipodistrofia como la lipomatosis asociadas a HAART son aún desconocidas. La distribución anatómica similar de las gibas de búfalo y de los lipomas de pacientes con lipomatosis simétrica múltiple (MSL) sugieren que ambas patologías podrían tener un origen común. De hecho, la MSL puede aparecer en pacientes con MERRF (*myoclonic epilepsy with ragged red fibers*), una alteración genética debida a una mutación puntual en el tRNA Lisina codificado por el mtDNA (Gamez et al., 1998) cuyos lipomas característicos expresan UCP-1 (Vila et al., 2000). Partiendo del hecho que se han observado una mezcla de adipocitos uni y

multivacuolados en lipomas de pacientes con mutaciones en el DNA mitocondrial (Cossarizza et al., 2001) y que una de las hipótesis planteadas como origen de la lipodistrofia asociada a HAART es la afectación a nivel mitocondrial de los NRTIs sobre los adipocitos (Brinkman et al., 1999), en este estudio se han analizado la expresión del marcador único de la célula adiposa marrón UCP-1 en varios lipomas de pacientes en terapia HAART. Los resultados muestran que estos lipomas expresan el gen UCP-1 e indican que células del linaje del adipocito marrón están implicadas en la lipomatosis asociada a HAART. Cabe destacar que los lipomas de origen HAART utilizados en el estudio no presentan la mutación MERRF (R. Martí y A.L. Andreu, datos no publicados), con lo que la expresión de UCP-1 es específicamente debida al tratamiento HAART.

El hecho que lipomas con una etiopatología tan diversa como mutaciones en el mtDNA o el tratamiento HAART compartan la expresión de UCP-1, refuerza la idea que una disfunción mitocondrial puede causar una masiva proliferación y diferenciación de células adiposas marrones. En humanos adultos, encontramos adipocitos marrones dispersos en los diferentes depósitos de grasa, adipocitos que en determinadas condiciones patofisiológicas pueden proliferar y diferenciarse, como en el caso del feocromocitoma (Bouillaud et al., 1988b). Además, un estudio reciente realizado en tejido adiposo de humanos adultos con resistencia a la insulina, muestra una expresión reducida de los genes característicos del adipocito marrón, sugiriendo la importancia de los adipocitos marrones que se encuentran en el tejido adiposo de adultos, en la sensibilidad a la insulina (Yang et al., 2003). Los adipocitos marrones podrían ser una diana preferencial para la toxicidad inducida por HAART, debido a su alto contenido en mitocondrias, por lo que una disfunción mitocondrial podría dar lugar, como mecanismo de compensación, a una proliferación de los adipocitos marrones. Además, se ha descrito que, en tejido adiposo subcutáneo de zonas lipoatróficas de pacientes de SIDA con terapia HAART, se observa una morfología dual blanco/marrón de los adipocitos, resultados que implicarían aún de manera más clara al adipocito marrón en la lipodistrofia asociada a HAART (Lloreta et al., 2002).

Un análisis de los niveles de expresión de UCP-1 en los diferentes depósitos grasos de pacientes afectados por la lipodistrofia, ayudaría a aclarar la idea de si la inducción de UCP-1 es un fenómeno exclusivo para la lipomatosis o si ocurre como parte de las alteraciones en el tejido adiposo visceral y subcutáneo asociadas con la lipodistrofia asociada a HAART.

Como ya se ha comentado anteriormente, una de las hipótesis que se plantean como posible causa de la lipodistrofia asociada a HAART se basa en la capacidad de los NRTIs de inhibir la función de la DNA polimerasa γ , causando depleción del mtDNA y

produciendo disfunción mitocondrial en los adipocitos. Basándonos en esta hipótesis y en los resultados obtenidos en el capítulo anterior, que implican al adipocito marrón en la lipomatosis asociada a HAART, se ha querido profundizar en el estudio de la mitocondriogénesis en el adipocito marrón. Para ello, se han realizado estudios básicos de los factores reguladores de la función mitocondrial en el adipocito marrón, estudios que ayudarán a analizar más en detalle el efecto de los fármacos antiretrovirales sobre la biología del adipocito marrón (ver último capítulo).

ESTUDIO DE NUEVOS FACTORES REGULADORES DE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL EN EL ADIPOCITO MARRÓN

El control de la expresión génica de los componentes del sistema OXPHOS es un proceso esencial para la biogénesis mitocondrial y para la capacidad de las células a adaptarse a los requerimientos energéticos según la situación. Este control se lleva a cabo a través de una regulación coordinada entre los genes codificados por el DNA nuclear y los codificados por el mtDNA. En esta regulación coordinada, encontramos factores de transcripción codificados por el genoma nuclear que regulan tanto la transcripción como la replicación del mtDNA (como TFAM, TFB1M y TFB2M), así como factores de transcripción que regulan la expresión de genes implicados en biogénesis mitocondrial (como PGC-1 α), tanto de las subunidades nucleares de los complejos del sistema OXPHOS como de las proteínas reguladoras de la expresión del mtDNA.

Los mecanismos por los cuales estos factores responden a señales extracelulares e intracelulares indicativas del estado energético de la célula están mayoritariamente aún por determinar. En este capítulo se estudia la regulación de la expresión de nuevos factores reguladores de la función mitocondrial en adipocitos marrones.

El adipocito marrón es una célula cuya función principal es la de disipar energía en forma de calor cuando la situación lo requiere. De esta manera, la diferenciación de una célula precursora está estrechamente relacionada con el aumento en el contenido de mitocondrias (juntamente con el aumento de UCP-1) y de la misma manera, cuando las necesidades fisiológicas lo requieren, este contenido mitocondrial puede variar considerablemente (Klingenspor et al., 1996; Martin et al., 1995). Todo esto sitúa al tejido adiposo marrón como un modelo óptimo para el estudio de los mecanismos moleculares implicados en la regulación de los genes OXPHOS en mamíferos.

El modelo celular de adipocitos marrones murinos en cultivo primario ha sido el modelo que se ha utilizado para este estudio. A lo largo del proceso de diferenciación

de un adipocito marrón en cultivo primario, la cantidad de mtDNA y su expresión aumenta, en coordinación con un incremento en la expresión de los componentes del sistema OXPHOS (Villena et al., 1998; Villena et al., 2002), eventos que también tienen lugar durante la etapa fetal de desarrollo del tejido adiposo marrón de ratón (Villena et al., 2002; Houstek et al., 1988).

El primer trabajo que se presenta en este capítulo es la **caracterización de la regulación de la expresión génica de dos factores de transcripción mitocondrial** descritos recientemente, **TFB1M y TFB2M**, en **adipocitos marrones**.

Hasta hace muy poco tiempo, el único factor de transcripción conocido para el mtDNA era TFAM. La clonación de TFB1M y TFB2M, dos nuevos factores de transcripción mitocondrial esenciales para la transcripción del mtDNA (Falkenberg et al., 2002; Rantanen et al., 2003) abrió una nueva vía de estudio de la regulación de la expresión del mtDNA.

En este estudio se ha observado que la expresión de estos dos factores de transcripción depende del estado de biogénesis mitocondrial del adipocito marrón, ya que en ratones *knock-out* para C/EBP α , que presentan una alteración en la biogénesis mitocondrial y unos niveles de los transcritos mitocondriales disminuidos (Carmona et al., 2002), se observa una disminución de la expresión de TFB1M y TFB2M en el TAM, y no de TFAM, indicando que estos factores de transcripción tendrían un papel importante en la transcripción del mtDNA durante el desarrollo del TAM *in vivo*. Por otro lado, los análisis de la expresión de TFB1M y TFB2M en el modelo de adipocitos marrones en cultivo primario indican que el aumento de expresión de estos factores durante la diferenciación adipocitaria sería lo que aumentaría la expresión de los transcritos mitocondriales asociados con la diferenciación (Villena et al., 1998), ya que TFAM presenta un perfil de expresión muy poco regulado.

Existen varias observaciones que sugerirían la implicación de varios factores de transcripción en la regulación de la expresión de TFB1M y TFB2M. Por un lado, C/EBP α parece estar jugando un papel importante, a juzgar por los resultados en los ratones *knock-out* para C/EBP α y el análisis de la región promotora de estos genes, que muestra putativos sitios de regulación de C/EBP α . Por otro lado, el hecho que la rosiglitazona, activador específico de PPAR γ , esté favoreciendo positivamente la expresión de TFB1M y TFB2M en el adipocito marrón, lo sitúa como un candidato en la regulación de estos factores de transcripción. Otros factores de transcripción implicados en la biogénesis mitocondrial como son NRF2/GABP y PGC-1 α (Villena et al., 1998; Puigserver and Spiegelman, 2003), también podrían estar regulando a TFB1M y TFB2M. Para NRF2/GABP se han encontrado elementos de respuesta

consensus en las regiones promotoras de los genes TFB1M y TFB2M de ratón y humano (Falkenberg et al., 2002; Rantanen et al., 2003) y PGC-1 α , como coactivador implicado en la biogénesis mitocondrial en el adipocito marrón, podría estar regulando la expresión de estos dos factores de transcripción a través de la activación de PPAR γ o NRF2/GABP.

A parte de la regulación de la expresión de TFB1M y TFB2M asociada con la biogénesis mitocondrial, se ha observado que la expresión de estos genes disminuye con el tratamiento de adipocitos marrones con el estímulo termogénico noradrenalina. Este bloqueo de la expresión se realiza a través de la vía β_3 -adrenérgica y es dependiente de transcripción e independiente de síntesis proteica. Esto sugeriría la presencia de elementos de respuesta negativos, sensibles a la vía adrenérgica, en las regiones promotoras de los genes TFB1M y TFB2M.

El tratamiento de adipocitos marrones diferenciados con NA también disminuye ligeramente la expresión de COII (subunidad II de la citocromo oxidasa codificada por el mtDNA), y TFB1M y TFB2M parece que estarían mediando este efecto, ya que el efecto de la NA sobre COII es dependiente de síntesis proteica (posiblemente de la síntesis de los factores de transcripción TFB1M y TFB2M que regularían su expresión).

Cuando se analiza el efecto de la NA sobre los TFBMs se observa que ésta tiene diferente efecto según sea en preadipocitos, adipocitos diferenciados o células indiferenciadas. La NA estimula la diferenciación, así como también la biogénesis mitocondrial, en preadipocitos marrones en cultivo (Nechad et al., 1987) y también, *in vivo*, estimula la diferenciación de los preadipocitos del TAM a adipocitos maduros (Mory et al., 1984). El hecho que la NA no esté disminuyendo los niveles de expresión de TFAM, TFB2M y COII en preadipocitos estaría de acuerdo con el efecto positivo de la NA sobre la diferenciación de los preadipocitos, aunque en desacuerdo con TFB1M, que sí está disminuido por la NA en preadipocitos. En células indiferenciadas, por haber sido cultivadas con un medio deplecionado, no se observa disminución ni de TFAM, TFB1M ni TFB2M por la NA, sugiriendo que el efecto de la NA sobre los TFBMs depende del estado de diferenciación de los adipocitos.

Las diferencias observadas del efecto de la NA sobre adipocitos diferenciados y preadipocitos y el hecho que en adipocitos diferenciados la NA esté actuando a través de receptores β_3 -adrenérgicos, son consistentes con los cambios en la expresión de los receptores β -adrenérgicos que tienen lugar durante la diferenciación del adipocito marrón. Se ha descrito que durante la diferenciación del adipocito marrón se produce un cambio en la expresión de receptores β_1 -adrenérgicos en preadipocitos a receptores β_3 -adrenérgicos en adipocitos diferenciados (Bronnikov et al., 1999). Sin embargo, dado que en preadipocitos el TFB1M sí que se ve disminuido por la NA, no debería excluirse la vía β_1 -adrenérgica en este efecto.

El significado biológico de este efecto de la NA sobre TFB1M y TFB2M en adipocitos marrones diferenciados es desconocido. La NA en adipocitos diferenciados, que ya presentan un contenido mitocondrial alto, ejerce su efecto mayoritariamente a través de la activación de la transcripción de UCP-1 y también activa la expresión de PGC-1 α , cuya función sería a su vez la de inducir específicamente UCP-1 (Cao et al., 2004). Así, la función de la NA en adipocitos diferenciados es más una función termogénica que una inducción de la biogénesis mitocondrial. De todas formas, los efectos de la NA disminuyendo la expresión de componentes del sistema OXPHOS parecen no estar restringidos al mtDNA, ya que también se ha observado que al menos la expresión de la subunidad IV de la citocromo oxidasa (COIV) también se encuentra disminuida por efecto de la NA (resultados no mostrados de este estudio) y un trabajo reciente ha descrito que los niveles de expresión de PPAR γ también se encuentran disminuidos por la NA en adipocitos marrones diferenciados, sin saber tampoco su significado funcional (Lindgren et al., 2004).

Los resultados presentados en este trabajo sugieren que la regulación de la expresión génica de los factores de transcripción mitocondriales TFB1M y TFB2M podría jugar un papel importante en la regulación de la transcripción del mtDNA durante la biogénesis mitocondrial asociada a la diferenciación del adipocito marrón. Así, la expresión de estos factores de transcripción se ve inducida por estímulos adipogénicos como la insulina o la activación de PPAR γ . Por el contrario, la noradrenalina disminuye la transcripción de TFB1M y TFB2M, especialmente cuando los adipocitos marrones están diferenciados, y esto atribuye a la vía adrenérgica un papel diferencial en el control de la biogénesis mitocondrial y la expresión del mtDNA en dependencia del estado de diferenciación del adipocito marrón.

La regulación que se observa de la expresión de los TFBMs por agentes exógenos confiere a estos factores de transcripción la capacidad de modular la expresión del mtDNA. Este hecho tiene implicaciones importantes (como se verá en el siguiente capítulo), ya que se convierten en potenciales dianas terapéuticas para incrementar la expresión del mtDNA, en situaciones como patologías de origen genético o farmacológico debidas a una disminución en la cantidad de mtDNA.

El siguiente trabajo presentado en este capítulo es el del **estudio de la expresión del gen PGC-1 α y su regulación en adipocitos marrones en cultivo primario**.

PGC-1 α es un coactivador transcripcional implicado en numerosas respuestas relacionadas con la homeostasis energética, como la termogénesis adaptativa y la

biogénesi mitocondrial, entre otras. Este coactivador se ha descrito como el mediador de la inducción de UCP-1 en el adipocito marrón en respuesta a estímulos termogénicos (Puigserver et al., 1998) y como un regulador esencial en la biogénesis mitocondrial (Puigserver et al., 1998; Tiraby et al., 2003; Wu et al., 1999a).

Este estudio, llevado a cabo utilizando el modelo celular del adipocito marrón en cultivo primario, ha permitido estudiar la expresión del gen PGC-1 α y la regulación de su expresión génica.

El perfil de expresión de PGC-1 α durante la diferenciación de adipocitos marrones en cultivo primario (muy similar al de UCP-1) y la inducción de la expresión de PGC-1 α por la NA dependiente de la vía β_3 -adrenérgica, sitúan a PGC-1 α como un marcador del estado de diferenciación, de la estimulación termogénica y de biogénesis mitocondrial del adipocito marrón.

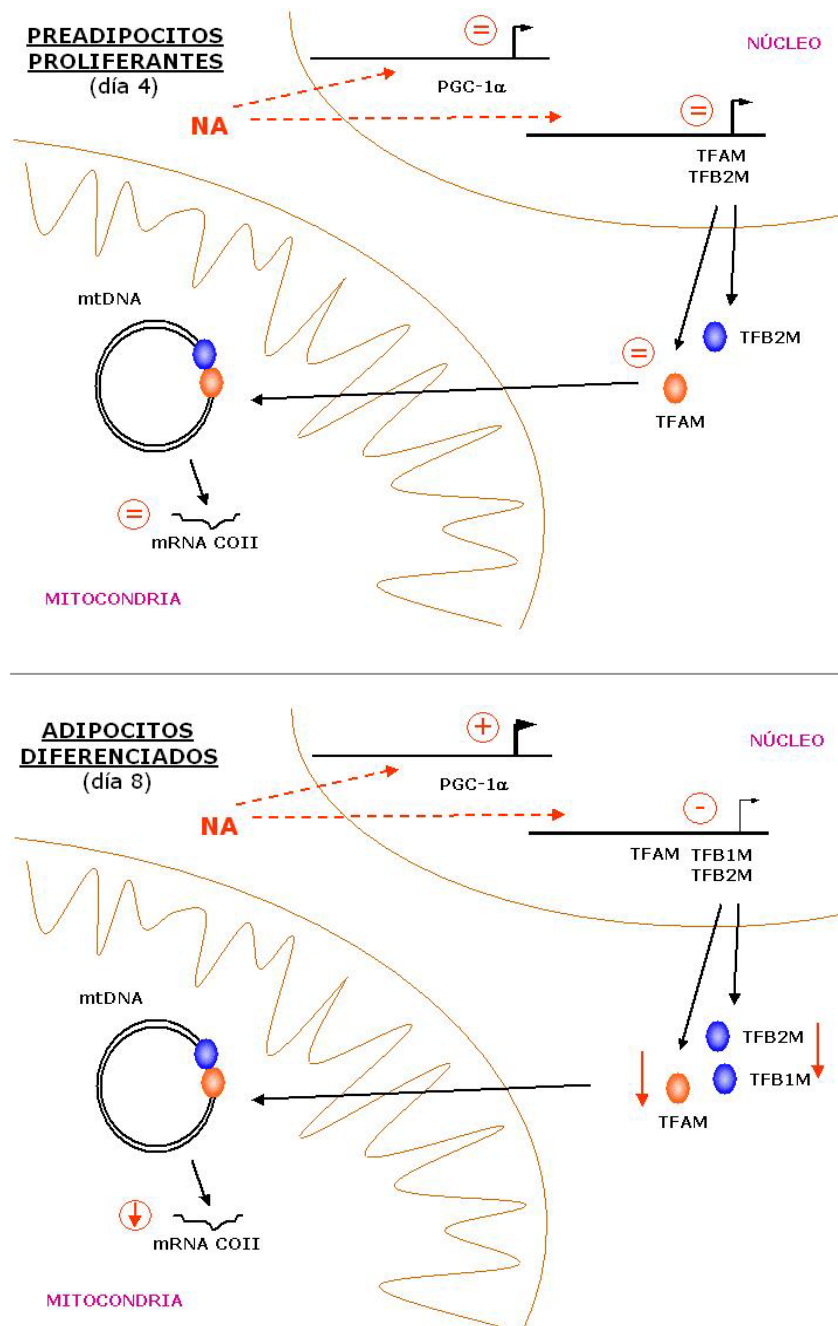
La inducción de PGC-1 α por la NA en adipocitos diferenciados es independiente de la síntesis proteica y dependiente de la transcripción, resultados que indican que el efecto de la NA sobre la expresión del gen PGC-1 α es transcripcional y que están en concordancia con la presencia de un elemento de respuesta a AMPc descrito en el promotor del gen PGC-1 α (Handschin et al., 2003).

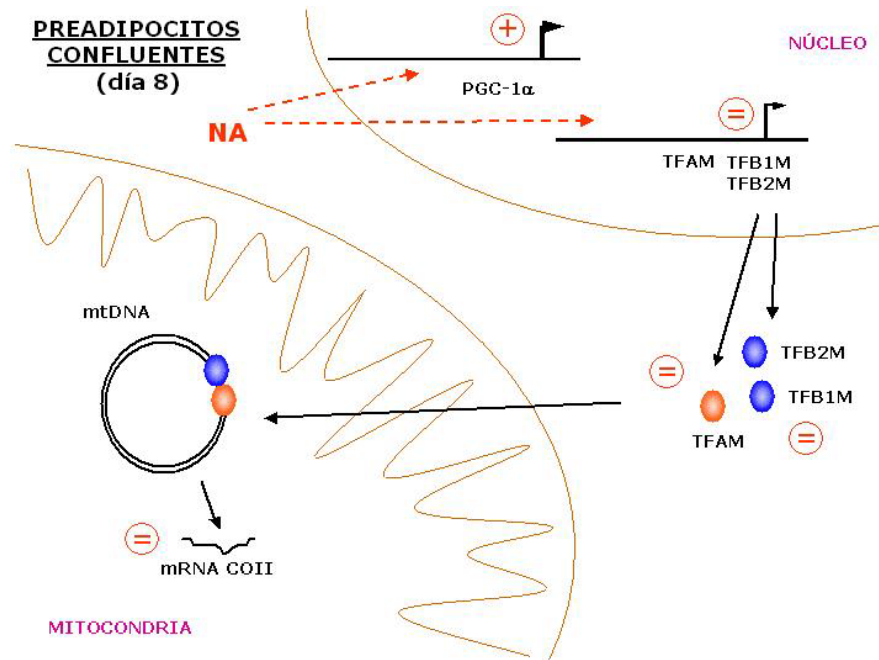
Los niveles de expresión más altos de PGC-1 α observados en células diferenciadas respecto a células indiferenciadas indican que la expresión de este gen se correlaciona muy bien con el estado de diferenciación del adipocito marrón y en consecuencia también con el grado de desarrollo de las mitocondrias, que en células indiferenciadas es muy bajo. La adición de insulina al medio delipidado reestablece parcialmente los niveles de expresión PGC-1 α y la adición del activador específico PPAR γ rosiglitazona recupera la expresión a los niveles de las células diferenciadas, sugiriendo que este factor de transcripción adipogénico podría estar activando la transcripción de PGC-1 α , además de favoreciendo la diferenciación de estas células y así también favorecer la expresión de PGC-1 α .

La respuesta de PGC-1 α a la NA también depende del estado de diferenciación de los adipocitos marrones, aunque en células indiferenciadas también se da una inducción de la expresión de PGC-1 α por la NA, a diferencia del efecto de bloqueo de la NA sobre la expresión de los TFBMs que no se da en células indiferenciadas. El grado de inducción de PGC-1 α por la NA en las células con medio delipidado con insulina alcanza los niveles de la inducción en las células diferenciadas y en presencia de rosiglitazona la inducción de PGC-1 α por la NA es mucho mayor que en los adipocitos maduros, indicando que la NA y el agonista PPAR γ podrían tener un efecto sinérgico sobre la inducción de la expresión de PGC-1 α en estas células.

Como ya se ha comentado anteriormente, la NA estimula la diferenciación de los preadipocitos marrones, induciendo también la biogénesis mitocondrial en estas

células (Nechad et al., 1987). Los resultados obtenidos en preadipocitos indican que éstos no aumentan los niveles de expresión de PGC-1 α en respuesta a la NA, resultados que estarían en desacuerdo con el papel de la NA en los preadipocitos induciendo la diferenciación adipocitaria y la biogénesis mitocondrial, donde PGC-1 α está jugando un papel importante.





Esquemas del efecto de la NA sobre la expresión de PGC-1 α y los factores de transcripción mitocondrial TFMs (TFAM, TFB1M y TFB2M) en preadipocitos marrones, adipocitos marrones diferenciados y células indiferenciadas.

La segunda parte de este trabajo se llevó a cabo con el objetivo de estudiar la regulación de la expresión de PGC-1 α en adipocitos marrones diferenciados, en respuesta a determinados compuestos. PGC-1 α y UCP-1 son dos genes altamente relacionados con el proceso de la termogénesis adaptativa, por lo que los compuestos utilizados para el estudio fueron aquellos de los que se conoce su actividad sobre la transcripción del gen UCP-1.

La expresión del gen PGC-1 α se ve inducida por agonistas PPAR y agonistas RXR, pero no responde a agonistas específicos RAR, por lo que la vía de activación de la transcripción del gen PGC-1 α por el ácido retinoico vía RAR queda descartada.

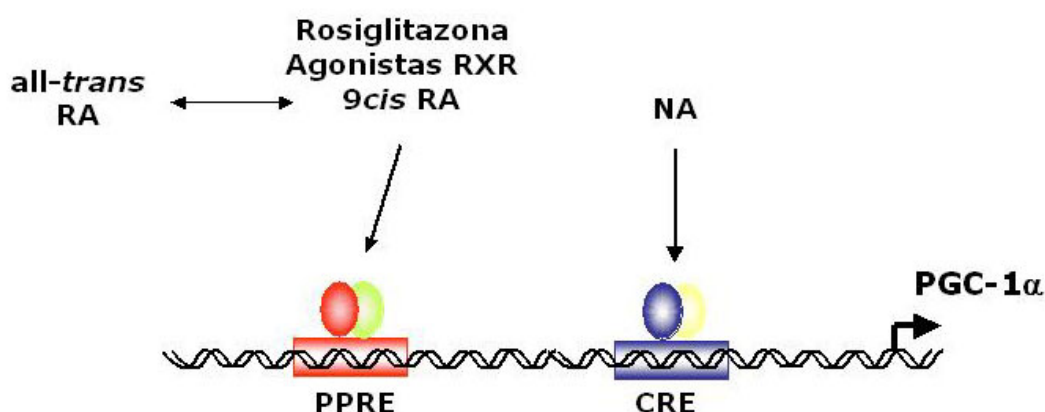
Un análisis más detallado de la activación de la expresión del mRNA de PGC-1 α por el agonista PPAR γ rosiglitazona y los activadores de la vía RXR, nos indica que la inducción de PGC-1 α por el agonista PPAR γ necesita que PPAR γ sea funcional y los agonistas RXR necesitarían heterodimerizar con PPAR γ para poder activar la expresión de PGC-1 α . Estos resultados indicarían que la vía PPAR γ y la RXR actuarían juntas (probablemente vía heterodímeros) en la regulación de la expresión de PGC-1 α , a diferencia de los que ocurre en la regulación transcripcional del gen UCP-1, donde la

respuesta a agonistas RAR y RXR es independiente de la respuesta a PPAR (Alvarez et al., 2000).

La inducción de la expresión de PGC-1 α por la rosiglitazona y el 9cisRA (activador de la vía RXR) es independiente de la activación de los receptores α y β -adrenérgicos, resultados que no contradicen la idea que la rosiglitazona y la NA podrían estar teniendo un efecto sinérgico en la inducción de la expresión de PGC-1 α , ya que este efecto podría producirse en algún otro nivel por debajo de la activación de los receptores adrenérgicos.

El análisis de la inducción de la expresión de PGC-1 α por la rosiglitazona y la vía RXR en situaciones de inhibición de la síntesis proteica y la rápida inducción que se observa de PGC-1 α por la rosiglitazona (5 horas) refuerzan aún más la idea que estos agonistas están activando la expresión del gen PGC-1 α a través de una vía transcripcional. Datos preliminares de nuestro laboratorio confirman que el promotor génico de PGC-1 α se activa por rosiglitazona y agonistas RXR de forma dependiente de la cotransfección con estos receptores.

Por último, los estudios en preadipocitos indican que ni el agonista PPAR γ ni los activadores de la vía RXR son capaces de inducir la expresión de PGC-1 α , igual que la NA en preadipocitos, que tampoco induce la expresión de PGC-1 α . Este hecho podría estar relacionado con que la expresión de PPAR γ y RXR α en preadipocitos es mucho menor que en adipocitos diferenciados (Alvarez et al., 2000; Valmaseda et al., 1999), lo que explicaría la falta de inducción en estas células. Estos resultados indicarían que el gen PGC-1 α en el estado de preadipocito sería incapaz de responder a la inducción por la NA, agonista PPAR γ y activadores RXR, que sí que inducen la expresión de PGC-1 α en adipocitos diferenciados.



Representación esquemática de las vías de regulación de la expresión de PGC-1 α en adipocitos marrones. Se hipotetiza la presencia de un posible PPRE en el promotor de PGC-1 α .

En este segundo bloque de resultados se han estudiado dos factores reguladores de la función mitocondrial y su papel en el proceso de la biogénesis mitocondrial en adipocitos marrones: Los recientemente descritos TFBMs, TFB1M y TFB2M y el coactivador PGC-1 α . Como ya se ha mencionado anteriormente, PGC-1 α es un coactivador que se ha implicado de manera importante en el proceso de la biogénesis mitocondrial (Puigserver et al., 1998; Tiraby et al., 2003; Wu et al., 1999a). Como tal, podría pensarse que estuviera implicado en la regulación de la expresión de los TFBMs. Los resultados obtenidos en este estudio indican que PGC-1 α podría estar mediando este efecto a través de la vía PPAR γ , ya que la vía PPAR γ y su agonista rosiglitazona son dos vías comunes en la regulación de la expresión tanto de PGC-1 α como de los TFBMs. Por otro lado, y contrariamente a este hecho, al analizar la vía de la NA y la implicación de ésta en la regulación de los TFBMs y de PGC-1 α , observamos que esta vía tiene efectos contrarios en la regulación de la expresión de estos factores: mientras que la NA está induciendo la expresión de PGC-1 α de manera muy importante, la expresión de TFB1M y TFB2M se ve disminuida por efecto de la NA. Estos resultados indicarían vías independientes a los TFBMs de regulación de la biogénesis mitocondrial por PGC-1 α . PGC-1 α , en adipocitos marrones, estaría más implicado en la inducción de la expresión de UCP-1 que en el proceso de biogénesis mitocondrial.

En un estudio paralelo realizado con un conocido inhibidor de la diferenciación adipocitaria, **el litio**, quisimos analizar **el efecto de este fármaco**, que se utiliza actualmente para el tratamiento de trastornos bipolares, **sobre la diferenciación del adipocito marrón en cultivo primario**. Los resultados indican que el litio, aunque tiene efectos inhibidores globales sobre la diferenciación adipocitaria, tal y como se ha descrito para el adipocito blanco, los genes expresados diferencialmente en el adipocito marrón son mucho más sensibles a la acción inhibidora del litio, como UCP-1, PGC-1 α y PPAR α . Estos resultados muestran como un compuesto que está bloqueando de manera tan importante la diferenciación del adipocito marrón puede no afectar de manera tan drástica la biogénesis mitocondrial. De hecho, datos preliminares de nuestro laboratorio indican que el tratamiento de adipocitos marrones en cultivo primario con 5mM de LiCl durante el proceso de diferenciación no afecta la expresión de los factores de transcripción mitocondrial TFB1M y TFB2M, respaldando la idea que la función mitocondrial de los adipocitos marrones es la menos afectada por el tratamiento con litio.

EFFECTO DE LOS FÁRMACOS ANTIRETROVIRALES EN ADIPOCITOS EN CULTIVO

Las características corporales y metabólicas del síndrome de la lipodistrofia asociada a HAART sugieren que podría ser debido a una disfunción adipocitaria. Inicialmente, se atribuyó el origen de la lipodistrofia asociada a HAART a los inhibidores de la proteasa vírica, y de hecho las alteraciones metabólicas asociadas a este síndrome están estrechamente relacionadas con el uso de los PIs (Purnell et al., 2000; Noor et al., 2001; Rakotoambinina et al., 2001; Vigouroux et al., 1999), pero pronto se observó que pacientes que nunca habían recibido PIs, pero sí NRTIs, también padecían lipodistrofia (Carr and Cooper, 2000; Madge et al., 1999). Existen numerosos estudios que observan una alteración en el metabolismo lipídico del adipocito blanco en cultivo debido a tratamientos con PIs, resultados que podrían contribuir a explicar el origen de este síndrome (Gougeon et al., 2004). Por otro lado, otra hipótesis que hay sobre la etiopatología del síndrome de la lipodistrofia asociada a HAART se basa en la capacidad de los NRTIs de inhibir, no sólo la transcriptasa reversa del VIH, sino también la actividad de la DNA polimerasa γ , que se encarga de la replicación del mtDNA. Esto daría lugar a una disfunción mitocondrial, una alteración de la funcionalidad de la célula adiposa (Brinkman et al., 1999) y situaría a los NRTIs como posibles responsables de la lipodistrofia asociada a HAART.

Aunque existen varios estudios que muestran depleción de mtDNA en tejido adiposo subcutáneo de pacientes con lipodistrofia (Shikuma et al., 2001; Nolan et al., 2003), que corroborarían la hipótesis mitocondrial, hay un número menor de estudios que analicen el efecto de los RTIs sobre la biología del adipocito. En los mamíferos existen dos tipos de adipocitos, el adipocito blanco, que almacena la energía sobrante en forma de triacilglicéridos y provee de energía cuando la situación energética lo requiere y el adipocito marrón, que disipa el exceso de energía en forma de calor, gracias a la presencia única de la proteína desacopladora UCP-1 y un alto contenido en mitocondrias (Ricquier and Bouillaud, 2000). El tejido adiposo blanco es el mayoritario en humanos adultos y el que se ve afectado en la lipodistrofia asociada a los fármacos antiretrovirales, mientras que el tejido adiposo marrón en humanos es fisiológicamente importante en la etapa neonatal, encontrando en la etapa adulta adipocitos marrones dispersos en diferente proporción en los distintos depósitos de grasa corporal (Oberkofler et al., 1997).

El objetivo principal de este capítulo es el de analizar el efecto de los RTIs sobre la biología del adipocito marrón, utilizando como modelo celular adipocitos marrones murinos en cultivo primario. Basándonos en los resultados del primer capítulo de esta tesis que implican al adipocito marrón en la lipomatosis asociada a HAART y considerando al adipocito marrón como un buen modelo para estudiar la toxicidad

mitocondrial de los fármacos antiretrovirales sobre el adipocito, se ha querido analizar el efecto de los RTIs sobre la diferenciación adipocitaria, la biogénesis mitocondrial y la expresión de marcadores específicos de la célula adiposa marrón. La segunda parte de este capítulo incluye la puesta a punto del modelo celular de adipocitos blancos humanos en cultivo primario y el abordaje del estudio del efecto del NRTI didanosina sobre la diferenciación adipocitaria y sobre la funcionalidad mitocondrial de adipocitos blancos humanos.

La primera parte de este capítulo es el estudio de **la proteína desacopladora 1 (UCP-1) y la biogénesis mitocondrial como dianas de la toxicidad inducida por los inhibidores de la transcriptasa reversa en adipocitos marrones**

El modelo celular de adipocitos marrones es un buen modelo para el estudio de la toxicidad mitocondrial inducida por los NRTIs y su relación con la etiopatología del síndrome de la lipodistrofia asociada a HAART, dado que los adipocitos marrones presentan una gran cantidad de mitocondrias bien estructuradas y expresan la proteína UCP-1.

Se ha descrito que en determinadas condiciones patofisiológicas se puede producir una proliferación y diferenciación de los adipocitos marrones que se encuentran dispersados en los depósitos de grasa, como en el caso de feocromocitoma o hibernomas (Oberkofler et al., 1997), además de que se ha correlacionado un polimorfismo en la región promotora del gen UCP-1 con obesidad (Oppert et al., 1994), situando a la proteína UCP-1 y al tejido adiposo marrón como participantes en el mantenimiento del peso corporal y en la regulación del balance energético en adultos. Adicionalmente, en relación con la lipodistrofia asociada al tratamiento antiretroviral, en el capítulo anterior hemos descrito que la lipomatosis inducida por HAART implica al adipocito marrón, en base a la expresión de UCP-1 en lipomas de pacientes que reciben HAART, así como también otros estudios han observado una morfología de los adipocitos de tejido adiposo subcutáneo más parecida a un adipocito marrón que a uno blanco (Lloreta et al., 2002).

Los estudios presentados en este trabajo se han realizado con adipocitos marrones murinos en cultivo primario. El tratamiento crónico de adipocitos marrones (durante todo el proceso de diferenciación) con los RTIs estudiados (estavudina, zidovudina, didanosina y lamivudina) no altera la diferenciación morfológica de estas células ni la expresión génica de los marcadores de diferenciación. En cambio, el tratamiento con el NNRTI nevirapina ejerce un efecto positivo global sobre el proceso de diferenciación de los adipocitos marrones, mientras que el otro NNRTI utilizado efavirenz bloquea la diferenciación de estas células. Este efecto del efavirenz sobre el

proceso de diferenciación adipocitaria se ha descrito en otros modelos de células adiposas, donde se ha observado que se debe a un bloqueo en la síntesis lipídica debido a interferencias con el factor de transcripción SREBP-1c (Hadri et al., 2004). Dados estos resultados, el efecto negativo del efavirenz sobre la diferenciación no ha sido estudiado con más detalle.

El efecto global positivo de la nevirapina sobre la diferenciación de los adipocitos marrones se observa, no sólo en una mayor cantidad de lípidos contenidos en las células, sino también en una expresión incrementada de los marcadores de diferenciación, en un incremento en la cantidad de mtDNA y de la expresión de genes mitocondriales y en un incremento en la expresión de UCP-1. A diferencia de lo que se observa para la estavudina, que incrementa la expresión de UCP-1 de manera específica tanto en tratamientos crónicos, como en agudos sobre adipocitos diferenciados (ver más adelante), la nevirapina sólo induce la expresión de UCP-1 cuando se encuentra durante todo el proceso de diferenciación (y no induce UCP-1 en tratamientos agudos de adipocitos diferenciados), corroborando su acción positiva global sobre la diferenciación de los adipocitos marrones.

Al analizar el efecto a nivel mitocondrial de los NRTIs sobre los adipocitos marrones en cultivo primario, se observa que, mientras que el tratamiento crónico con el NRTI lamivudina no altera ni la cantidad de mtDNA ni la expresión de genes mitocondriales en los adipocitos marrones, los otros tres NRTIs, en tratamientos crónicos, disminuyen la cantidad de mtDNA. Sólo la didanosina causa una disminución de la transcripción de los genes codificados por el mtDNA, indicando que en las células tratadas crónicamente con zidovudina y estavudina se está produciendo una compensación a nivel transcripcional de la depleción del mtDNA.

Esta compensación se puede observar en las células tratadas con estavudina, que presentan unos niveles de expresión de los factores de transcripción mitocondrial TFAM, TFB1M y TFB2M superiores a las células sin tratar, sugiriendo que estos factores de transcripción mitocondriales sobreexpresados compensarían la depleción del mtDNA. Las células tratadas con zidovudina que también presentan depleción del mtDNA no presentan niveles más altos de expresión de TFAM y TFBMs, mientras que las células tratadas con didanosina muestran unos niveles de expresión más bajos de los factores de transcripción mitocondriales, hecho que explicaría los niveles bajos de expresión de los transcritos mitocondriales, el hecho que no haya compensación de la depleción del mtDNA y la disminución que se observa en el contenido de la proteína COI. Los mecanismos de compensación a una depleción del mtDNA se han sugerido como explicación a la falta de correlación entre el tiempo de exposición a los NRTIs y el desarrollo de efectos adversos. Recientemente hemos descrito que en células

sanguíneas periféricas de pacientes asintomáticos tratados con NRTIs, la depleción del mtDNA que se observa en estas células es compatible con una expresión del mtDNA inalterada (ver anexo), poniendo en relevancia la importancia de los mecanismos de compensación que se dan lugar en presencia de una depleción de mtDNA.

El análisis del efecto de los NRTIs sobre la expresión de UCP-1, marcador específico del adipocito marrón y quien da a estas células su capacidad termogénica, muestra que sólo la estavudina es capaz de inducir la expresión de UCP-1 en adipocitos marrones en cultivo primario, inducción que es específica ya que otros marcadores mitocondriales y adipogénicos no se ven inducidos por este fármaco. Únicamente, es inducida la expresión por estavudina de PGC-1 α , conocido coactivador transcripcional de UCP-1 (Barbera et al., 2001).

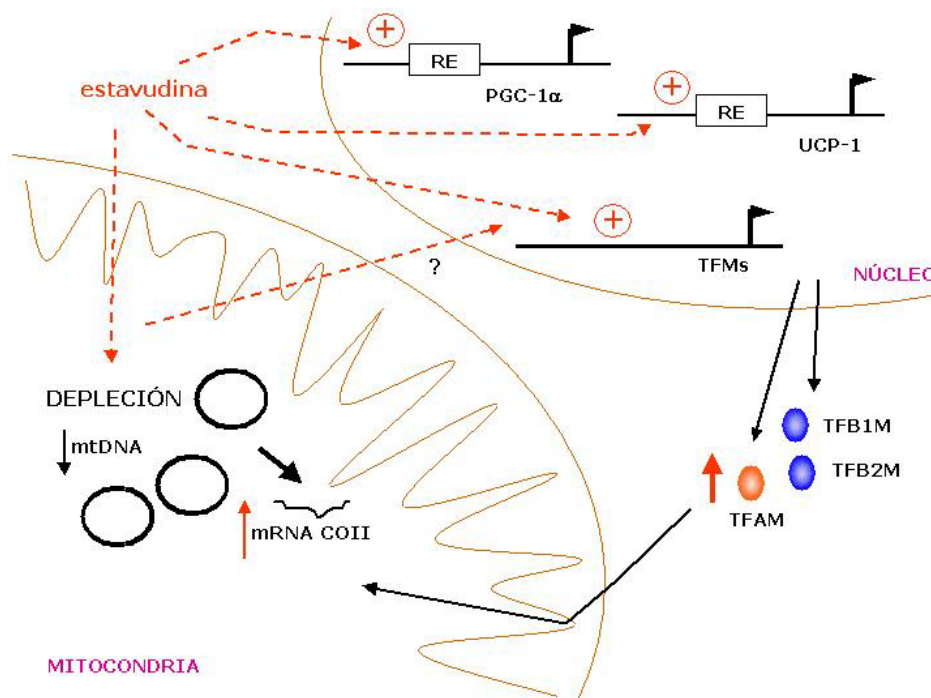
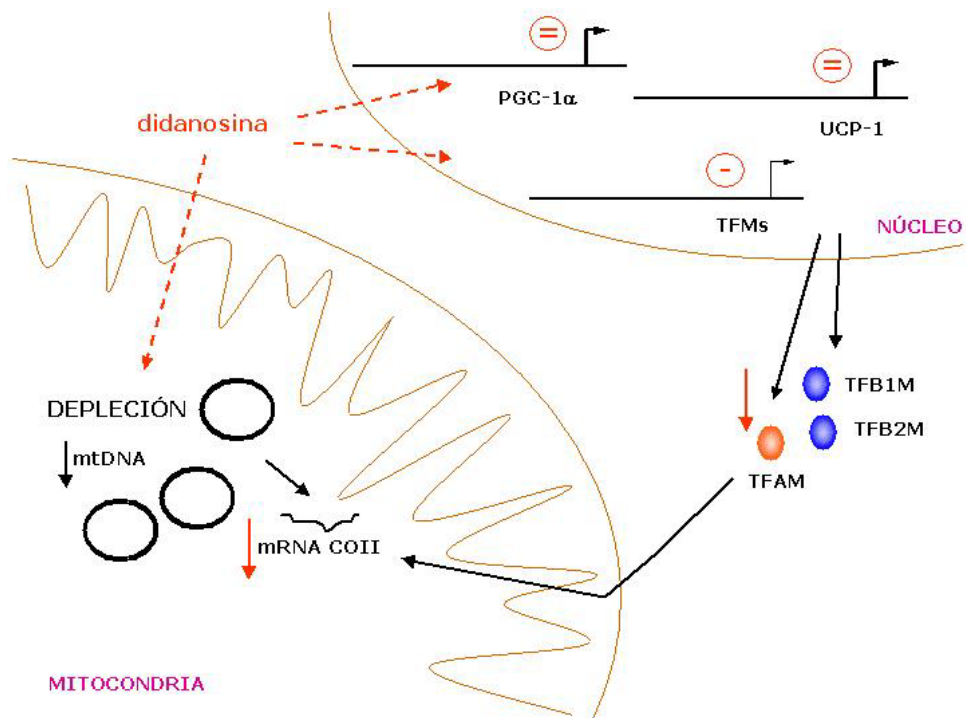
La inducción específica de la expresión de UCP-1 por la estavudina en adipocitos marrones se corrobora con la inducción que se observa de UCP-1 en adipocitos marrones ya diferenciados, tratados durante 24 horas con estavudina. Esta inducción indica que el efecto directo de la estavudina sobre la expresión del gen UCP-1 no depende del proceso de diferenciación del adipocito.

Al analizar las vías a través de las cuales la estavudina está induciendo la expresión de UCP-1, se analizaron, entre otras, la vía del ácido retinoico, compuesto que se conoce que es un potente inductor de la expresión de UCP-1 (Alvarez et al., 2000). Se observó que la inducción del promotor de UCP-1 por la estavudina requiere la presencia del receptor de ácido retinoico (RAR) en células del linaje del adipocito marrón HIB-1B y la presencia del antagonista específico RAR AGN 193109 bloquea la inducción de UCP-1 por la estavudina en adipocitos marrones, tanto en tratamientos crónicos, como de 24 horas. Estos resultados demuestran que la estavudina está induciendo la expresión de UCP-1 a través de la vía del ácido retinoico y que a su vez este fármaco estaría interfiriendo en la vía del ácido retinoico en adipocitos marrones. Desconocemos las bases moleculares de esta interferencia ya que no parecen haber similitudes estructurales entre la molécula de estavudina y los retinoides. Datos preliminares indican que el efecto de la estavudina activando la vía del ácido retinoico no estaría restringido a UCP-1 sino que sería más general y afectaría también a otros genes diana del ácido retinoico como RAR β (datos no publicados) e incluso PGC-1 α .

Se ha propuesto que los fármacos antiretrovirales podrían estar alterando el metabolismo de la vitamina A, así como las vías de señalización mediadas por retinoides, aunque este efecto se ha relacionado más con los PIs (Carr et al., 1999; Lenhard et al., 2000b). Recientemente, se ha descrito que pacientes que reciben HAART presentan alteraciones en los niveles de retinol en plasma, consecuencia de una posible alteración en la vía de síntesis de ácido retinoico (Toma et al., 2001).

Una cuestión que surge de la inducción de la expresión de UCP-1 por algunos RTIs es cuál serían las consecuencias fisiológicas del aumento de la expresión de UCP-1 en el tejido adiposo. Un desacoplamiento mitocondrial en los adipocitos debido a la presencia de UCP-1 podría dar lugar a alteraciones de la secreción de adipocitoquinas, señales intracelulares apoptóticas (que darían lugar a apoptosis de los adipocitos en zonas lipoatróficas) y/o alteraciones del estado energético intracelular que influenciarían el metabolismo de la célula adiposa hacia el metabolismo de los lípidos y el incremento del gasto energético. De hecho, recientemente se ha descrito que pacientes lipodistróficos que reciben HAART presentan un incremento del gasto energético (Kosmiski et al., 2001), que sería compatible con un aumento del desacoplamiento mitocondrial.

Como resumen de este trabajo, se puede concluir que en el modelo *in vitro* de adipocitos marrones, las mitocondrias son dianas directas del efecto de los NRTIs estavudina, didanosina y zidovudina, aunque en las células tratadas con estavudina y zidovudina se llevan a cabo mecanismos que compensan transcripcionalmente la pérdida de mtDNA. La sobreexpresión de los factores de transcripción TFAM, TFB1M y TFB2M, en el caso de la estavudina, podrían ser los responsables de esta compensación. Estos resultados explicarían las diferencias en los efectos de las varias combinaciones de fármacos que reciben los paciente de SIDA y abren nuevas posibilidades para monitorizar la potencial toxicidad mitocondrial de los fármacos antiretrovirales. La inducción de UCP-1 por el NRTI estavudina, el efecto global positivo de la nevirapina sobre la diferenciación del adipocito marrón y el hecho que lipomas de pacientes en terapia antiretroviral presenten una expresión elevada de UCP-1 (capítulo primero), estarían de acuerdo con la implicación del linaje de la célula adiposa marrón en la etiopatología de la lipodistrofia asociada a HAART.



Esquema representativo del efecto de la didanosina y la stavudina a nivel mitocondrial y sobre la expresión de UCP-1 y PGC-1 α en adipocitos marrones. RE indica la presencia de regiones génicas reguladas por ácido retinoico.

El siguiente trabajo de este capítulo trata del **desarrollo de un modelo de diferenciación de adipocitos blancos humanos en cultivo primario y el estudio del efecto del NRTI didanosina** sobre estas células.

Los adipocitos blancos humanos diferenciados en cultivo primario presentan la morfología y funcionalidad características de un adipocito blanco, con lo que son una herramienta útil y fiable para numerosos estudios *in vitro* que requieran estudiar la célula adiposa humana.

En el caso del estudio de la etiopatología de la lipodistrofia asociada a HAART, este modelo permite estudiar el efecto específico de los fármacos antiretrovirales sobre la biología del adipocito blanco humano, permitiendo analizar el efecto de cada fármaco, bien por separado o en combinación, de manera controlada. Estos estudios se presentan complicados cuando se realizan con en el tejido adiposo de pacientes de SIDA que están recibiendo un cóctel de medicamentos, muy poco controlado y a menudo muy cambiante a lo largo de la duración del tratamiento.

En este estudio se han analizado los efectos del NRTI didanosina sobre la diferenciación adipocitaria y a nivel mitocondrial en adipocito blancos, dada la profunda afectación mitocondrial que produce la didanosina en adipocitos marrones (ver trabajo anterior).

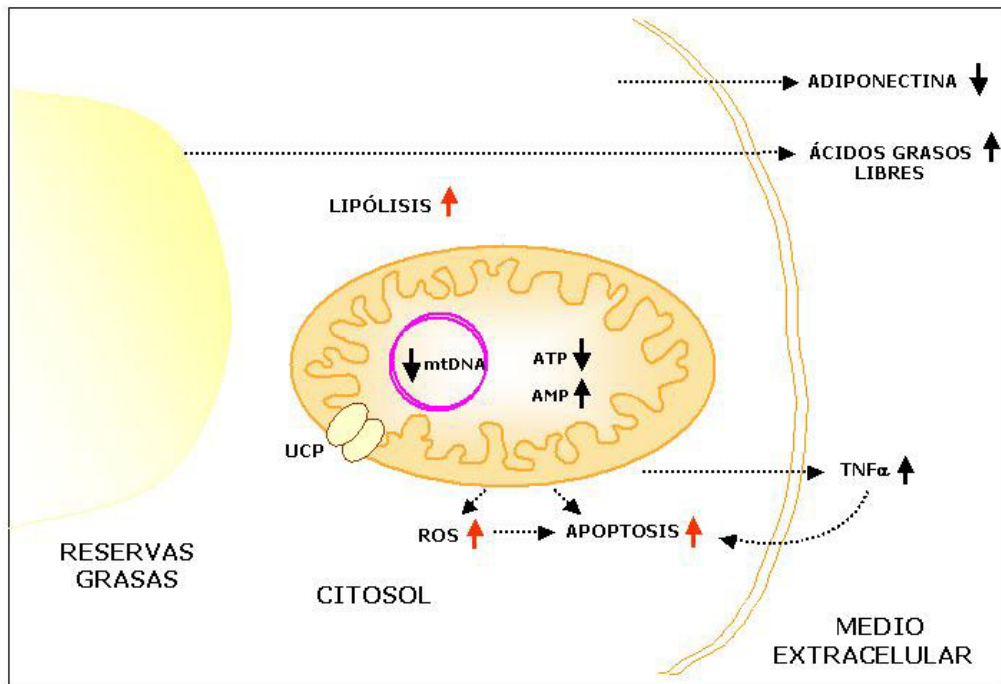
Los resultados muestran que la didanosina no altera la diferenciación morfológica de las células adiposas, aunque la expresión del marcador de diferenciación PPAR γ sí se ve disminuida respecto a las células sin tratar. La alteración de marcadores de diferenciación como PPAR γ indicaría que este fármaco está afectando la diferenciación de los adipocitos blancos a un nivel que no sería obvio al observar la acumulación lipídica, pero que podría afectar la funcionalidad del adipocito.

La posible toxicidad mitocondrial, una de las posibles causas de la lipodistrofia asociada a HAART, de la didanosina sobre estas células se observa en los niveles bajos de expresión de la COII y el Cit b, ambos codificados por el mtDNA. Este fármaco podría estar bloqueando la actividad de la DNA polimerasa γ , tal y como se ha descrito que hace *in vitro* (Kakuda, 2000), disminuyendo la cantidad de mtDNA y provocando la disminución de la abundancia de los transcritos mitocondriales COII y Cit b. La inhibición de la función oxidativa mitocondrial por la didanosina en adipocitos blancos se ve aún más demostrada con la observación que el tratamiento crónico de las células con didanosina aumenta considerablemente la producción de lactato por parte de éstas.

En el capítulo anterior se sugiere que los factores de transcripción mitocondrial TFAM, TFB1M y TFB2M podrían jugar un papel muy importante en la compensación que se observa a nivel transcripcional de la depleción del mtDNA producido por algún

NRTI, (concretamente por la estavudina en el modelo de adipocitos marrones en cultivo primario). Sin embargo, en adipocitos blancos humanos en cultivo primario tratados con didanosina, aunque estos factores de transcripción mitocondriales se ven aumentados, sobre todo TFAM y TFB1M, esto no es capaz de normalizar la expresión de los transcritos mitocondriales y de hecho, tampoco se consigue evitar el incremento en la producción de lactato de estas células. Cabe señalar, no obstante, que a diferencia de los adipocitos marrones, el TFB2M, que se ha descrito como el factor de transcripción mitocondrial más activo *in vitro* (Falkenberg et al., 2002) no se halla aumentado, hecho que podría explicar la falta de compensación en estas células.

El modelo celular de adipocitos blancos humanos en cultivo primario es un buen modelo para estudiar el efecto de los fármacos antiretrovirales, como el NRTI didanosina, sobre la biología del adipocito humano. Se ha demostrado que este fármaco presenta toxicidad mitocondrial sobre adipocitos blancos, una toxicidad que se observa tanto a nivel transcripcional como a nivel funcional, dado que las células tienen disminuida la obtención de energía por la vía oxidativa. Alteraciones en la actividad oxidativa mitocondrial en el adipocito blanco podrían ser un sensor del estado energético de la célula e influenciar en la biología del adipocito, así como en la síntesis y secreción de factores paracrinos y endocrinos.



Esquema hipotético de los mecanismos por los cuales una alteración en la función mitocondrial en el adipocito podría desencadenar respuestas intracelulares que darían lugar a lipotrofia y a través de señales extracelulares, alteraciones metabólicas y resistencia a la insulina. En el adipocito, la lipólisis da lugar a la producción de ácidos grasos libres que son secretados a la circulación sanguínea y se convierten en agentes inductores de la resistencia a la insulina. La disfunción mitocondrial inducida por delección del mtDNA o por desacoplamiento alterado debido a la expresión anormal de las proteínas UCP puede disminuir la producción de ATP celular influenciando la secreción de múltiples hormonas y citoquinas por parte del adipocito, por ejemplo, disminuyendo la secreción de adiponectina y incrementando la liberación de TNF- α . Además, se puede inducir la producción de ROS, que darían lugar a una diferenciación alterada y fenómenos de apoptosis en los adipocitos.

CONCLUSIONES

1. La expresión del gen UCP1 en los lipomas de pacientes infectados con HIV y en terapia antiretroviral de elevada actividad indica que existe una alteración en la diferenciación blanco/marrón como parte de la lipodistrofia propia de estos pacientes.
2. La diferenciación del adipocito marrón va asociada a la inducción de factores clave en la biogénesis mitocondrial como son los factores de transcripción mitocondriales B1 y B2 y el co-activador PGC-1 α , en asociación con una incrementada biogénesis mitocondrial. La expresión génica de estos factores es regulada de forma positiva por agonistas de PPAR γ e insulina, pero no ocurre así para la acción noradrenérgica.
3. En adipocitos marrones diferenciados, la noradrenalina reprime la expresión de los factores de transcripción mitocondriales B1 y B2 por mecanismos dependientes de transcripción e independientes de síntesis proteica. Ello da lugar a una reducción en la expresión de genes codificados por el genoma mitocondrial como la subunidad II de la citocromo c oxidasa. Este efecto es dependiente del grado de diferenciación del adipocito marrón y se ve favorecido por la presencia de activadores de PPAR γ o insulina.
4. La expresión del co-activador PGC-1 α se induce por noradrenalina, agonistas PPAR γ y agonistas RXR en adipocitos marrones diferenciados, pero no en preadipocitos. Dichas inducciones se dan por mecanismos independientes de síntesis proteica. La inducción de PGC-1 α por la noradrenalina se ve favorecida por la presencia de activadores PPAR γ . La inducción por agonistas PPAR γ y RXR se bloquea por un antagonista PPAR γ y es independiente de la activación de receptores adrenérgicos. Se describe por tanto una nueva vía de regulación PPAR γ /RXR-dependiente del gen PGC-1 α .
5. El litio inhibe de forma dependiente del tiempo de exposición y de la dosis la diferenciación morfológica de adipocitos marrones en cultivo, así como la expresión de genes de expresión preferencial en el adipocito marrón.
6. Los inhibidores de la transcriptasa reversa no-análogos de nucleósido tienen un efecto opuesto sobre la diferenciación del adipocito marrón: el efavirenz bloquea la acumulación de lípidos mientras que la nevirapina tiene un efecto positivo global sobre la diferenciación adipocitaria, biogénesis mitocondrial y expresión de UCP-1.

Conclusiones

7. Los inhibidores de la transcriptasa reversa análogos de nucleósidos no afectan la diferenciación del adipocito marrón. La estavudina, zidovudina y didanosina provocan una disminución en el contenido de mtDNA, aunque la expresión del genoma mitocondrial sólo se encuentra disminuida en las células tratadas con didanosina. La compensación a la depleción del mtDNA en las células con estavudina podría explicarse por el aumento en la expresión de los factores de transcripción mitocondrial.
8. La estavudina induce de manera específica la expresión génica de UCP-1 mediante mecanismos que implican la vía del ácido retinoico.
9. Preadipocitos humanos en cultivo primario pueden diferenciarse a adipocitos con características morfológicas, de expresión génica y funcionales propias del adipocito blanco humano. La didanosina ejerce efectos compatibles con un bloqueo en la función mitocondrial