



Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
Facultat de Biologia
Universitat de Barcelona
Programa de Doctorado de Biomedicina, Bienio 2000-2002

DIFERENCIACIÓN ADIPOCITARIA Y FACTORES REGULADORES DE LA BIOGÉNESIS MITOCONDRIAL. EFECTOS DE LOS FÁRMACOS ANTIRETROVIRALES

Memoria presentada para optar al título de Doctora en Biología por

M^a Luisa Rodríguez de la Concepción

Dr. Francesc Villarroya Gombau

Profesor Titular de Bioquímica
y Biología Molecular

Dra. Marta Giralt Oms

Profesor Titular de Bioquímica
y Biología Molecular

PRESENTACIÓN

ÍNDICE

I. PRESENTACIÓN	1
II. INTRODUCCIÓN	5
II.1. EL TEJIDO ADIPOSO	7
II.1.1. EL TEJIDO ADIPOSO BLANCO	8
II.1.1.1. EL TEJIDO ADIPOSO BLANCO COMO ÓRGANO ENDOCRINO	8
Leptina	9
IL-6	10
TNF- α	10
Adiponectina	11
Ácidos grasos libres	11
II.1.1.2. LA DIFERENCIACIÓN DEL ADIPOCITO BLANCO	12
II.1.1.2.1. Cascada de activación de los diferentes factores de transcripción adipogénicos	13
II.1.1.2.2. Factores de transcripción implicados en la adipogénesis	14
C/EBPs	15
ADD1/SREBP1	16
PPAR γ	17
RXR	19
II.1.1.2.3. Factores que estimulan la adipogénesis	20
Insulina y IGF-1	20
MCSF	20
Ácidos grasos y prostaglandinas	21
Glucocorticoides	22
II.1.1.2.4. Factores que inhiben la adipogénesis	22
Ácido retinoico	22
Pref-1	23
Wnts	23

	TGF- β	24
	Citoquinas inflamatorias y hormona del crecimiento	24
	PGF _{2α}	25
II.1.2.	EL TEJIDO ADIPOSO MARRÓN	27
II.1.2.1.	FUNCIÓN Y CARACTERÍSTICAS	27
II.1.2.2.	LA TERMOGÉNESIS ADAPTATIVA Y SU REGULACIÓN	29
II.1.2.2.1.	Regulación por noradrenalina	31
	PGC-1 α y la termogénesis adaptativa	32
II.1.2.2.2.	Regulación por hormonas tiroideas	34
II.1.2.2.3.	Regulación por ácido retinoico	35
II.1.2.2.4.	Insulina y IGF-1	36
II.1.2.3.	EL TEJIDO ADIPOSO MARRÓN EN HUMANOS	37
II.1.2.4.	MODELOS DE ESTUDIO DEL TEJIDO ADIPOSO MARRÓN	38
II.1.2.4.1.	Desarrollo del tejido adiposo marrón <i>in vivo</i>	38
	Diferenciación morfológica	38
	Diferenciación de la capacidad termogénica	39
	Diferenciación adipocitaria	39
II.1.2.4.2.	Modelos celulares de estudio del adiposo marrón	39
	Cultivos primarios de adipocitos marrones	39
	Línea celular HIB-1B	40
II.1.2.5.	UCP-1	41
II.1.2.5.1.	La proteína desacoplante UCP-1	41
II.1.2.5.2.	Regulación de la expresión de UCP-1	42
II.1.2.5.3.	Regulación del promotor del gen UCP-1	42
	Región 5' proximal	43
	Región <i>enhancer</i> distal	44

II.1.2.6. UCP-2 y UCP-3	46
II.1.3. BIOGÉNESIS MITOCONDRIAL	48
II.1.3.1. EL SISTEMA OXPHOS	48
II.1.3.1.1. Componentes del sistema OXPHOS	48
II.1.3.2. LOS GENES OXPHOS	50
II.1.3.3. REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN DE LOS GENES OXPHOS	52
II.1.3.3.1. Factores de transcripción nucleares	55
NRF-1	55
NRF-2	55
PGC-1 α	56
Otros factores de transcripción	56
II.1.3.3.2. Factores de transcripción nucleares reguladores del mtDNA	57
TFAM	57
mTERF	57
TFB1M y TFB2M	58
II.1.3.3.3. Regulación de la transcripción mitocondrial por glucocorticoides y hormonas tiroideas	58
II.1.3.4. REGULACIÓN DE LA BIOGÉNESIS MITOCONDRIAL EN EL TEJIDO ADIPOSO MARRÓN	60
Mitocondriogénesis durante el desarrollo del tejido adiposo marrón	60
Cambios relacionados con la temperatura ambiental	61
Cambios en respuesta a la dieta	61
Cambios durante la gestación y la lactancia	62
I.2. EL VIH Y SU TRATAMIENTO	63
II.2.1. GENERALIDADES	63
II.2.1.1. Terapia antiretroviral	63
II.2.1.2. Fármacos antiretrovirales	64
II.2.1.3. Retos para una terapia exitosa	66
II.2.2. EL SÍNDROME DE LA LIPODISTROFIA ASOCIADA A HAART	67
II.2.3. ETIOPATOGENIA DE LA LIPODISTROFIA ASOCIADA A HAART	69

II.2.3.1. La aportación de los PIs a la lipodistrofia asociada a HAART	71
II.2.3.2. La aportación de los NRTIs a la lipodistrofia asociada a HAART	73
II.2.3.3. Estudios de pacientes HIV con lipodistrofia asociada a HAART	75
II.2.3.4. Posible papel del ácido retinoico a la lipodistrofia asociada a HAART	76
II.2.3.5. La participación de las citoquinas proinflamatorias en la lipodistrofia asociada a HAART	77
II.2.4. LIPOMATOSIS ASOCIADA A HAART	78
III. OBJETIVOS	79
IV. RESULTADOS	83
1. IMPLICACIÓN DEL ADIPOCITO MARRÓN EN LA LIPOMATOSIS INDUCIDA POR LA TERAPIA ANTIRETROVIRAL	85
- <i>Uncoupling protein 1 gene expression implicates brown adipocytes in highly active antiretroviral therapy-associated lipomatosis</i>	87
2. ESTUDIOS SOBRE NUEVOS FACTORES REGULADORES DE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL EN EL ADIPOCITO MARRÓN	91
- <i>Regulation of gene expression for the mitochondrial transcription factors B1 and B2 in brown adipocyte opposite effects of differentiation and noradrenaline</i>	93
- Estudio de la expresión del gen PGC-1 α en adipocitos marrones murinos en cultivo primario. Identificación de una nueva vía de regulación por agonistas PPAR y retinoides	123
- <i>Lithium inhibits brown adipocyte differentiation</i>	145
3. EFECTO DE LOS FÁRMACOS ANTIRETROVIRALES EN ADIPOCITOS EN CULTIVO	161
- <i>Uncoupling protein-1 and mitochondria biogenesis are targets of reverse transcriptase inhibitor-induced toxicity in brown adipocytes</i>	163

- Desarrollo de un modelo de diferenciación de adipocitos blancos humanos en cultivo primario. Efecto del inhibidor de la transcriptasa reversa análogo de nucleósido (NRTI) didanosina	199
V. DISCUSIÓN GLOBAL	215
VI. CONCLUSIONES	237
VII. BIBLIOGRAFÍA	241
VIII. ANEXO	273
- <i>Mitochondrial biogenesis in brown adipose tissue is associated with differential expression of transcription regulatory factors</i>	275
- <i>Uncoupling protein and brown adipocyte mitochondria as potential targets of reverse transcriptase inhibitor-induced lipodystrophy</i>	289
- <i>Up- regulatory mechanisms compensate mitochondrial DNA depletion in asymptomatic individuals receiving stavudine plus didanosine</i>	297

ABREVIATURAS

11βHSD1	<i>11β-hydroxysteroid dehydrogenase 1</i>
9cis RA	Ácido 9cis-retinoico
ACO	Acetil-Coa carboxilasa
ADD1/SREBP1	<i>Adipocyte differentiation and determination factor 1/sterol regulatory element binding protein 1</i>
AMPc	AMP cíclico
ANT	Transportador de nucleótidos de adenina
AP-1	Proteína activadora 1
ATPasa	ATP sintetasa
bZIP	<i>Basic leucine zipper</i>
C/EBP	Proteína de unión a CCAAT/ <i>enhancer</i>
CBP	<i>CREB binding protein</i>
CO	Citocromo oxidasa
CPT-I	<i>Carnitine palmitoyltransferase I</i>
CRABP-1	Proteína citoplasmática de unión a ácido retinoico 1
CRBP	<i>Citoplasmatic retinol-binding protein</i>
CRE	Elemento de respuesta a AMPc
CREB	Proteína de unión a CRE
Cytb	Citocromo b
D-loop	<i>Displacement loop</i>
DNC	<i>Deoxynucleotide carrier</i>
DR	Repeticiones directas
EGF	Factor de crecimiento epidermal
ETS	<i>E26 transformation-specific</i>
FABP	Proteína de unión a ácidos grasos
FAS	<i>Fatty acid synthase</i>
FIAF	<i>Fasting-induced adipose factor</i>
FPLD	Lipodistrofia parcial familiar
GABP	<i>GA-binding protein</i>
GH	Hormona del crecimiento
GLUT-4	Transportador de glucosa de tipo 4
GR	Receptor de glucocorticoides
GRE	Elemento de respuesta a glucocorticoides
HAART	<i>Highly active antiretroviral therapy</i>
HDL	Lipoproteínas de alta densidad

HSL	Lipasa sensible a las hormonas
IBMX	Isobutilmetilxantina
IFN-α	Interferon α
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IGF-1R	Receptor de IGF-1
IL-6	Interleuquina 6
IMC	Índice de masa corporal
IRS-1 y 2	Substrato del receptor de insulina 1 y 2
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
L-PK	Piruvato quinasa de hígado
LPL	Lipoproteína lipasa
LRP	<i>Low density lipoprotein-receptor-related protein</i>
MCSF	Factor estimulador de colonias de macrófagos
MMI	Membrana mitocondrial interna
MRP RNA	<i>Mitochondrial RNA processing RNA</i>
MSL	Lipomatosis simétrica múltiple
mtDNA	DNA mitocondrial
mTERF	Mitochondrial transcription termination factor
NA	Noradrenalina
ND	NADH deshidrogenasa
NEFAs	Ácidos grasos no esterificados
NNRTI	<i>Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor</i>
NRF-1 (NRF-2)	<i>Nuclear respiratory factor-1 (and 2)</i>
NRTI	<i>Nucleoside reverse transcriptase inhibitor</i>
OXPHOS	Sistema cadena respiratoria/fosforilación oxidativa
p38MAPK	<i>p38 mitogen-activated protein kinase</i>
PAI-1	<i>Plasminogen activator inhibitor 1</i>
PEPCK	Fosfoenol-piruvato carboxi quinasa
PGC-1α	Coactivador del receptor activado por proliferadores peroxisomales γ -1 α
PGF_{2α}	Prostaglandina F _{2α}
PGI₂	Prostaciclina
PGJ₂	Prostaglandina J ₂
PI3-K	Fosfatidilinositol 3-quinasa
PI	Protease inhibitor
PKA	Proteína quinasa A
PPAR	Receptor activado por proliferadores peroxisomales
PPRE	Elemento de respuesta a PPARs

Pref-1	Factor preadipocitario 1
RA	Ácido retinoico
RALDH	Retinoaldehido deshidrogenasa
RAR	Receptor del ácido retinoico
RARE	Elemento de respuesta a RA
RBP	<i>Retinol-binding protein</i>
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RXR	Receptor X de retinoides
SCD1	<i>Stearoyl-Coa desaturase 1</i>
SIDA	Síndrome de la inmunodeficiencia adquirida
SV-40	<i>Simian virus-40</i>
T₃	Hormona tiroidea
T₃RE	Elemento de respuesta a T ₃
T₄	Tiroxina
TAB	Tejido adiposo blanco
TAM	Tejido adiposo marrón
TFAM	<i>Mitochondrial transcription factor A</i>
TFBM	<i>Mitochondrial transcription factor B</i>
TG	Triacilglicéridos
TGF-β	<i>Transforming growth factor β</i>
TK	Timidina quinasa
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
TR	Receptor de hormonas tiroideas
TZDs	Tiazolidindionas
UCP-1	Proteína desacopladora 1
UCP-2	Proteína desacopladora 2
UCP-3	Proteína desacopladora 3
VDR	Receptor de la vitamina D
VIH	Virus de la inmunodeficiencia adquirida
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad

I. PRESENTACIÓN

La Tesis Doctoral que aquí se presenta ha estado realizada en el grupo de investigación *Genética y Biología de Proteínas Mitocondriales y Patologías Asociadas* del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona, bajo de la dirección del Dr. Francesc Villarroya y la Dra. Marta Giralt.

El trabajo consta de los siguientes apartados: *Introducción, Objetivos, Resultados, Discusión global, Conclusiones, Bibliografía y Anexo*. En la *Introducción* se tratan los aspectos más relevantes sobre el tejido adiposo blanco y marrón, poniendo especial énfasis en la biogénesis mitocondrial y su regulación, así como también aparece un apartado de la terapia antiretroviral para el tratamiento del VIH y lo que hasta el momento se conoce sobre la etiopatología del síndrome de la lipodistrofia asociada a la terapia antiretroviral. El apartado de *Resultados* consta de los artículos publicados o enviados a publicar y de una serie de trabajos a los que se les ha dado formato de artículo para mantener la coherencia de presentación. Los trabajos enviados a publicar presentan las leyendas de las figuras debajo de la figura correspondiente para facilitar la lectura de los mismos. En la *Discusión global* se comentan los resultados obtenidos desde una óptica integradora y finalmente, en el apartado de *Bibliografía* se detallan las referencias bibliográficas citadas en los apartados de *Introducción* y *Discusión*, mientras que cada trabajo incluido en los *Resultados* viene acompañado de su propia bibliografía citada.

INTRODUCCIÓN

II. INTRODUCCIÓN

II. 1. EL TEJIDO ADIPOSEO

Los animales se encuentran constantemente bajo la amenaza de la falta de alimento, por lo que el almacenamiento de energía en su cuerpo es esencial para la mayoría de sus actividades. Consecuentemente, los animales presentan mecanismos altamente sofisticados que les permiten almacenar la energía en el **tejido adiposo**.

El tejido adiposo juega un papel crucial en la regulación y la disfunción patológica de la homeostasis energética. En mamíferos, la homeostasis energética es un compromiso entre el aporte y el gasto energético y en buena parte, el equilibrio se consigue a través de la respuesta coordinada entre el sistema nervioso y los tejidos adiposos, siendo estos últimos la fuente principal de reserva del organismo y también el sistema de disipación energética. Situaciones como la ingesta, la gestación, la necesidad de producir calor y el ejercicio físico son procesos que determinarán el balance energético y en última instancia afectarán el peso corporal. La producción o movilización de las reservas lipídicas se llevará a cabo en función del excedente calórico procedente de la dieta o de la carencia energética, como en situaciones de ayuno, respectivamente. Por lo que al metabolismo de la glucosa se refiere, ésta también es captada selectivamente por el tejido adiposo, dependiendo de la insulina, así como los ácidos grasos y el glicerol liberados por el tejido adiposo influirán en el metabolismo hepático y periférico de la glucosa.

En humanos se ha demostrado ampliamente que la diferenciación de la célula adiposa (el adipocito, que forma los tejidos adiposos) y la acumulación de grasa en la misma (hipertrofia) son procesos fuertemente relacionados con la aparición y desarrollo de la obesidad. La **obesidad** es el resultado de un desequilibrio entre la incorporación de energía y su utilización, resultando en un balance positivo y en una ganancia de peso. La obesidad implica un riesgo para la salud dado que lleva asociada todo un conjunto de anomalías metabólicas que se conocen como el **síndrome metabólico**. Éstas incluyen diabetes mellitus de tipo II, dislipidemia y enfermedades cardiovasculares.

Otra situación patológica, mucho menos frecuente en humanos, es la **lipopatofia** que se caracteriza por una escasez o insuficiencia de tejido adiposo, asociada con fenómenos de resistencia a la insulina y diabetes mellitus de tipo II (revisado por Reitman et al., 2000).

En mamíferos, existen dos tipos de tejidos adiposos: el **tejido adiposo blanco (TAB)** y el **tejido adiposo marrón (TAM)**. Ambos tienen capacidad de metabolizar y almacenar lípidos, sin embargo sus funciones son bien distintas. El tejido adiposo blanco es el órgano específico que almacena la energía sobrante en forma de grasa neutra después de una ingesta y cuando es necesario, es capaz de proveer de energía en forma de ácidos grasos y glicerol. El tejido adiposo marrón, por otro lado, tiene una función fisiológicamente opuesta: permitir la disipación de energía en forma de calor en vez del almacenamiento de ésta.

II. 1. 1. EL TEJIDO ADIPOSEO BLANCO

El tejido adiposo blanco, que es el tejido adiposo mayoritario, está extensamente distribuido por todo el cuerpo en grandes cantidades. El TAB contiene varios tipos celulares, como son adipocitos en los cuales se almacena las gotas de grasa, preadipocitos, fibroblastos, células endoteliales de los vasos sanguíneos y neurocitos.

Como ya se ha mencionado, su función sobre la homeostasis lipídica consiste en almacenar la energía sobrante en forma de triacilglicéridos y liberar ácidos grasos libres y glicerol cuando el gasto energético excede la ingesta de energía, bajo el control del sistema nervioso y endocrino.

II.1.1.1. EL TEJIDO ADIPOSEO COMO UN ÓRGANO ENDOCRINO.-

Tradicionalmente, se ha considerado al tejido adiposo blanco como un reservorio pasivo de energía, sin embargo, actualmente está plenamente establecido que el TAB, mediante la secreción de factores endocrinos y paracrinos, juega un papel mucho más activo en la regulación del metabolismo y la homeostasis corporal (Kershaw and Flier, 2004; Havel, 2004).

Ya en el 1987 se identificó al tejido adiposo como el lugar de mayor metabolización de hormonas esteroidales (Siiteri, 1987) y de producción de adiposina, un factor endocrino que está marcadamente disminuido en roedores obesos (Flier et al., 1987). La subsecuente identificación y caracterización de la leptina en el 1994 estableció de manera definitiva la idea del tejido adiposo como un órgano endocrino (Zhang et al., 1994). Actualmente, se sabe que el tejido adiposo es capaz de expresar y secretar una gran variedad de péptidos bioactivos, conocidos como

adipocitoquinas, que actúan de manera local (función autocrina/paracrina) y sistémica (endocrina). **Tabla 1**

Tabla 1. Principales moléculas sintetizadas por el tejido adiposo

Leptina	Disminuye la ingesta y regula el balance energético
TNF- α	Incrementa la lipólisis y activa la LPL
Resistina	Disminuyen sus niveles con la diferenciación y mejora la resistencia a la insulina
<i>Fasting-induced adipose factor</i> (FIAF)	Implicado en la regulación del metabolismo en situaciones de ayuno
<i>Plasminogen activator inhibitor-1</i> (PAI-1)	Contribuye al desarrollo de la obesidad y la resistencia a la insulina
Adipsina	Actúa probablemente a nivel del adipocito regulando el metabolismo lipídico
IL-6	Posible regulador del balance energético, contribuye a la resistencia a la insulina
Ácidos grasos	Reguladores de la expresión génica de genes relacionados con el metabolismo y transporte de los ácidos grasos
Adiponectina	Hormona con efectos antidiabéticos, antiinflamatorios y antiaterogénicos

Leptina.-

La identificación de la **leptina** como una hormona adipostática (Zhang et al., 1994), transformó la visión del tejido adiposo y de la obesidad. La leptina es una hormona polipeptídica producida en un 95% por el tejido adiposo (especialmente de depósitos subcutáneos) y sus niveles circulantes se correlacionan positivamente con el índice de masa corporal (Timchenko et al., 1997). Además, la comida, la composición de ésta, la temperatura ambiental, el ejercicio, el patrón de sueño y el balance energético son factores que regulan las concentraciones de leptina en plasma (Klein et al., 2000b; Coleman and Herrmann, 1999; Hilton and Loucks, 2000; Fain et al., 2004). Estas influencias parecen estar mediadas principalmente por la insulina, por la entrada de glucosa en los adipocitos y por reguladores del sistema nervioso simpáticos (Klein et al., 2000b; Coleman and Herrmann, 1999). La regulación de la secreción de leptina por estos factores, que reflejan el estado energético del organismo, sugiere que el tejido adiposo es capaz de detectar a corto y largo plazo cambios en los

Introducción

requerimientos energéticos corporales y modular su actividad endocrina en consecuencia. La función más importante de la leptina es, a través del sistema nervioso central, inhibir la ingesta, alterar el peso corporal, el gasto energético y la función neuroendocrina, así como a nivel periférico, afectar al músculo esquelético, hígado, páncreas, tejido adiposo y otros tipos celulares (Friedman and Halaas, 1998).

Interleuquina-6 (IL-6).-

La **IL-6**, que estructuralmente está relacionada con la leptina, actúa como una hormona. El tejido adiposo produce cantidades sustanciales de IL-6 y esta secreción puede llegar a representar entre el 10 y el 30% de los niveles circulantes en plasma (Fried et al., 1998). Los niveles de expresión de la IL-6 en el tejido adiposo y la concentración de IL-6 en plasma se correlacionan positivamente con fenómenos de obesidad, tolerancia alterada a la glucosa y resistencia a la insulina (Fernández-Real, 2003 211 /id). Tanto los niveles de expresión como de concentración en plasma disminuyen en situaciones de pérdida de peso. Además, los niveles de IL-6 en plasma son un buen indicador del posible desarrollo de diabetes mellitus de tipo II y enfermedades cardiovasculares.

TNF- α .-

TNF- α (factor de necrosis tumoral α) es una proteína transmembrana que sufre procesos de corte proteolítico dando lugar a la forma biológicamente activa que ejerce su función a través de receptores de tipo I y II. TNF- α se expresa y sintetiza, entre otros tejidos, en el tejido adiposo, por los adipocitos y células del estroma vascular (Fain et al., 2004). Los adipocitos también expresan ambos tipos de receptores de TNF- α (Ruan and Lodish, 2003). Aunque inicialmente TNF- α se relacionó con procesos de caquexia, actualmente se sabe que está implicado en la patogénesis de la obesidad y la resistencia a la insulina (Ruan and Lodish, 2003; Hotamisligil et al., 1993). Los niveles de TNF- α están aumentados en situaciones de obesidad en humanos y roedores y se correlacionan positivamente con adiposidad y resistencia a la insulina (Hotamisligil et al., 1993).

Se han descrito varios mecanismos potenciales de acción de TNF- α . En el tejido adiposo, TNF- α reprime genes involucrados en la captación y almacenamiento de ácidos grasos no-esterificados (NEFAs o *non-esterified fatty acids*) y glucosa, inhibe genes de factores de transcripción asociados con procesos de adipogénesis y lipogénesis e induce cambios en la expresión de varios factores secretados por el adipocito, como la adiponectina y la IL-6. En el hígado, TNF- α suprime la expresión de genes implicados en la captación de glucosa y el metabolismo y oxidación de ácidos grasos e induce la expresión de genes involucrados en la síntesis *de novo* de colesterol

y ácidos grasos (Ruan et al., 2002). Adicionalmente, TNF- α afecta la señalización de la insulina, mediante la activación de serina quinasas que fosforilan los substratos del receptor de insulina 1 y 2 (Miki et al., 2001), transformándolos en substratos pobres para las quinasas del receptor de insulina y acelerando su degradación (Hotamisligil, 2003). TNF- α además altera los procesos de señalización de la insulina, indirectamente mediante el incremento de los niveles de NEFAs en plasma.

Otro efecto de TNF- α sobre los adipocitos es la inducción de apoptosis (Prins et al., 1997) y el bloqueo de la diferenciación adipocitaria (Petruschke and Hauner, 1993; Xing et al., 1997) sugiriendo otro mecanismo por el cual esta citoquina está limitando un exceso de adiposidad.

Adiponectina .-

La **adiponectina** es una hormona peptídica que se expresa de manera abundante y específica en el tejido adiposo y circula en grandes cantidades por el torrente sanguíneo, en forma de varias isoformas proteicas (Chandran et al., 2003). Se han descrito dos receptores de adiponectina, AdipoR1 y 2 (Yamauchi et al., 2003), que se expresan principalmente en el músculo y en el hígado, respectivamente. La función que ejercerá esta adipocitoquina dependerá no sólo de su concentración en plasma y de sus propiedades si no también de la expresión tejido-específica de los receptores AdipoR1 y 2.

Se ha establecido una potente correlación inversa entre adiponectina y resistencia a la insulina y estados de inflamación. Las concentraciones de adiponectina se ven aún más disminuidas en situaciones de diabetes mellitus y resistencia a la insulina. Además, la administración de adiponectina recombinante revierte la resistencia a la insulina, en parte por el aumento de la oxidación de ácidos grasos y de la disipación de energía por parte del músculo esquelético y en parte por la inhibición de la captación de glucosa por parte del hígado. La adiponectina es única entre las hormonas ya que actúa facilitando la acción de otra hormona, la insulina.

Ácidos grasos libres .-

Los **ácidos grasos** no esterificados (NEFA) provienen del TAB como consecuencia de la lipólisis. La mayor proporción de los NEFA circulantes viaja unida a albúmina, mientras que una parte viaja sin unión. En tejidos lipogénicos como el hígado y el tejido adiposo, los ácidos grasos se pueden sintetizar *de novo* (lipogénesis) gracias a la glucosa que sufre el proceso de glicólisis. Por lo tanto, el hígado, el tejido adiposo y el músculo serán las principales dianas de regulación génica por los ácidos grasos. Además de su función como moléculas energéticas, los ácidos grasos también actúan como señales implicadas en la regulación de la expresión génica. Los ácidos

grasos estimulan la transcripción de genes que codifican para proteínas implicadas en el transporte de ácidos grasos, como la proteína de unión a ácidos grasos (FABP o *fatty acid binding protein*) y proteínas del metabolismo de ácidos grasos, como la LPL (lipoproteína lipasa), la CPT-I (*carnitine palmitoyltransferase I*) y las proteínas desacopladoras 2 y 3, entre otras. Por otro lado, también pueden inhibir la transcripción del transportador de glucosa GLUT4, la piruvato quinasa en hígado (L-PK o *liver pyruvate kinase*), la ácido graso sintasa (FAS o *fatty acid synthase*) y la leptina (revisado por Duplus, 2002 294 /id).

Una de las maneras por las cuales los ácidos grasos están actuando como reguladores de la expresión génica es mediante la activación directa de la actividad transcripcional de algunos receptores nucleares de hormonas, como el receptor activado por proliferadores peroxisomales o PPAR (*peroxisome proliferating activated receptor*). La activación de PPAR mediante la unión de determinados ácidos grasos a su dominio de unión a ligando, da lugar a una activación de la transcripción de genes relacionados con el propio metabolismo de los ácidos grasos, como la fosfoenolpiruvato carboxi quinasa (Clouthier et al., 1997) o la FABP, entre otros (Pegorier and Girard, 2004).

II.1.1.2. LA DIFERENCIACIÓN DEL ADIPOCITO BLANCO.-

De acuerdo con el modelo estándar, las células madre se convierten en preadipocitos cuando pierden la capacidad de diferenciarse en otros linajes mesenquimales, como son los miocitos, condriocitos o osteocitos, transformándose en células "predeterminadas" hacia el linaje del adipocito (Gregoire et al., 1998). Para el estudio del proceso de diferenciación adipocitaria, se han utilizado diversos modelos de cultivos celulares, en los que se incluyen las **líneas celulares preadipocitarias** y los **cultivos primarios de células precursoras** del estroma vascular del tejido adiposo (Gregoire et al., 1998).

La diferenciación de la célula adiposa ha sido ampliamente estudiada, a nivel transcripcional, en líneas celulares inmortalizadas de ratón, como son la línea celular **3T3-L1** y la línea celular **3T3-F442A**. Estas células son de morfología fibroblástica aunque están determinadas hacia el linaje del adipocito.

Aunque el establecimiento de dichas líneas celulares ha resultado clave para el estudio del proceso de diferenciación, no hay que olvidar que estas células presentan diversas características que dificultan una completa extrapolación de los procesos observados *in vitro* a lo que en realidad está ocurriendo *in vivo*. Primero, el hecho de ser células aneuploides puede influenciar su capacidad para diferenciarse y después,

hay que tener en cuenta que éstas células existen fuera del contexto de una matriz extracelular normal y unas estructuras de soporte. Otra limitación muy importante es que, hasta la fecha, no han permitido el estudio de las diferencias de comportamiento de la célula adiposa según el depósito del que provienen. *In vivo*, el TAB se localiza en varias regiones, incluyendo los depósitos perigonadal, omental, retroperitoneal y subcutáneos. Los preadipocitos aislados de los diferentes depósitos tienen distinto potencial adipogénico, la base del cual es completamente desconocida (Adams et al., 1997; Lefebvre et al., 1998; Djian et al., 1985). Adicionalmente, el comportamiento metabólico de células maduras difiere según el depósito anatómico. Por ejemplo, por lo que a la capacidad de respuesta a la estimulación adrenérgica se refiere, existen diferencias entre el depósito visceral, que es más sensible, y el subcutáneo (Ostman et al., 1979; Morimoto et al., 1997).

II.1.1.2.1. Cascada de activación de los diferentes factores de transcripción adipogénicos .-

El proceso de adipogénesis, *in vitro*, sigue una secuencia de pasos muy bien ordenados y caracterizados. Inicialmente, los preadipocitos proliferantes salen del ciclo celular, normalmente mediante procesos de inhibición por contacto, aunque se ha demostrado que células sembradas a baja densidad o que se encuentran en una suspensión de metilcelulosa pueden iniciar su diferenciación (Gregoire et al., 1998). Para parar la proliferación de éstas células y estimular la adipogénesis, se las trata con inductores adipogénicos que incluyen agonistas de glucocorticoides, un agente que incrementa la concentración de AMPc intracelular y una alta concentración de glucosa (para estimular los IGF-IR). Ligandos del receptor activado por proliferadores peroxisomales γ (PPAR γ), (por ejemplo las tiazolidindionas, TZDs) también son comúnmente utilizados para estimular la diferenciación de líneas celulares preadipocitarias y células primarias.

Los inductores de adipogénesis promueven a los preadipocitos a llevar a cabo una o dos rondas de expansión clonal antes de iniciarse los procesos de activación transcripcional de genes marcadores del adipocito y la adquisición del fenotipo adipocitario. El proceso de adipogénesis habitualmente se describe como una cascada de eventos genéticos (**Figura 1**). La primera fase de dicha cascada incluiría a la proteína de unión a CCAAT/enhancer β (**C/EBP β**) y **C/EBP δ** y estos factores de transcripción serían a su vez los responsables del inicio de la segunda fase: La activación de los factores de transcripción **PPAR γ** y **C/EBP α** , los genes maestros de todo el proceso de diferenciación. Durante la primera fase, las células fibroblásticas se

Introducción

redondean y se incrementan los niveles de los mRNA de marcadores adipogénicos como la LPL (MacDougald and Lane, 1995; Darlington et al., 1998). La aparición de PPAR γ y C/EBP α activa la expresión de si no todos, de la mayoría de los genes que caracterizan al fenotipo adipocitario, como son la FAS, la glicerofosfato deshidrogenasa, la acetil-CoA carboxilasa (ACO), el receptor de glucosa GLUT 4, el receptor de insulina y la proteína aP2/FABP (la proteína que liga ácidos grasos, específica del adipocito), entre otros (Spiegelman et al., 1993). A través de este proceso, en el citoplasma de la célula van apareciendo gotas lipídicas y a lo largo del tiempo, éstas irán incrementando y fusionándose hasta formar una o dos grandes gotas lipídicas que ocuparán gran parte del citoplasma.

C/EBP β parece que es capaz de inducir la expresión de C/EBP α , incluso en ausencia de PPAR γ (Kubota et al., 1999a), aunque este hecho es controvertido (Rosen et al., 1999). PPAR γ y C/EBP α a su vez inducirían la expresión de sí mismos, así como uno la del otro. La expresión forzada de PPAR γ (en presencia de sus ligandos) y C/EBP α estimula la adipogénesis aún en ausencia de agentes inductores exógenos. Aunque PPAR γ es suficiente para inducir la expresión de la mayoría de los genes adipocitarios, C/EBP α es necesario para conferir al adipocito sensibilidad a la insulina (Wu et al., 1999b).

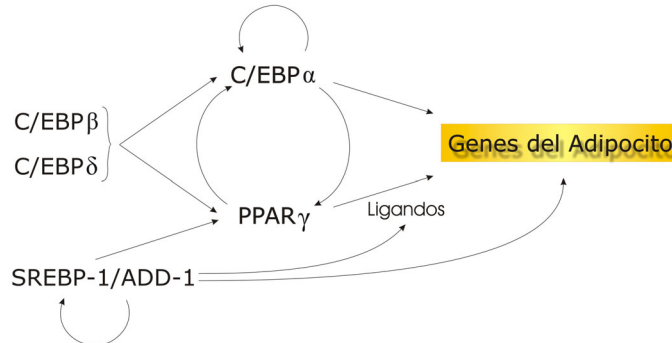


Figura 1. Factores de transcripción involucrados en la cascada de acontecimientos que dan lugar al inicio del programa adipogénico. Abreviaturas: C/EBP, CCAAT/enhancer binding protein; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; SREBP-1/ADD-1, sterol regulatory element binding protein/adipocyte differentiation and determination factor 1.

II.1.1.2.2. Factores de transcripción implicados en la adipogénesis .-

Muchas de las proteínas que permiten diferenciar al adipocito ven regulada su expresión por factores de transcripción que actúan como reguladores de la expresión

génica. Entre los factores de transcripción más importantes para el proceso de diferenciación destacan C/EBP α y el receptor nuclear PPAR γ . Otros factores de transcripción que destacan en la diferenciación adipocitaria son: C/EBP β , C/EBP δ , el factor de transcripción ADD1/SREBP1c y el receptor nuclear RXR α . (**Figura 2**)

C/EBPs.-

Las proteínas de unión a CCAAT/enhancer (**C/EBPs**) pertenecen a la familia de factores de transcripción bZIP (*basic leucine zipper*), dominio básico de unión al DNA y cremallera de leucina. Actúan como homo o heterodímeros y su distribución tisular no se limita al tejido adiposo (Lekstrom-Himes and Xanthopoulos, 1998). Sin embargo, la regulación de la expresión de varios miembros de la familia C/EBP se ha observado durante el proceso de adipogénesis, y estudios de pérdida o ganancia de función realizados recientemente indican que estas proteínas juegan un papel muy importante en el desarrollo de la célula adiposa.

La expresión ectópica de C/EBP β es suficiente para inducir la diferenciación de células 3T3-L1 sin que sea necesario añadir inductores hormonales; en el caso de C/EBP δ , estudios similares indican que dichos agentes prodiferenciadores son necesarios, pero el proceso de adipogénesis se ve acelerado (Yeh et al., 1995). C/EBP β además podría ser capaz de determinar las células hacia el linaje del adipocito así como promover su diferenciación; la expresión ectópica de C/EBP β (y no δ) en células fibroblásticas NIH 3T3 facilita la diferenciación de dichas células en presencia de inductores hormonales (Wu et al., 1995). Los fibroblastos de embriones que carecen de C/EBP β o C/EBP δ muestran una cierta pérdida de potencial adipogénico, pero las células que carecen de ambas proteínas tienen alterada de manera muy severa su capacidad para diferenciarse (Tanaka et al., 1997). Los resultados que se obtienen de ratones deficientes en estos factores de transcripción son bastante ambiguos, aunque en general respaldan la idea del papel de estos factores en el desarrollo de la célula adiposa. Estos ratones tienen un tejido adiposo blanco normal, aunque su tejido adiposo marrón muestra una acumulación lipídica disminuida y la expresión del gen UCP-1 (marcador específico del adipocito marrón) también disminuida. En cambio, los ratones deficientes en ambos factores de transcripción presentan un fenotipo mucho más severo. Aproximadamente el 85% de los animales mueren durante el período perinatal por causas desconocidas y el 15% restante que sobrevive tiene el TAM considerablemente reducido y el TAB disminuido (Tanaka et al., 1997). Es interesante destacar que la reducción del TAM se debe a una reducción en la acumulación lipídica, mientras que la reducción del TAB parece estar debida a una disminución en el número de células, células que cuando se diferencian tienen un tamaño, una morfología y una expresión génica normal.

Introducción

La implicación de C/EBP α en el proceso de adipogénesis está respaldada por resultados más definitivos. La sobreexpresión de C/EBP α en células 3T3-L1 induce su diferenciación (Freytag et al., 1994; Lin and Lane, 1994) y la expresión de un RNA antisentido de C/EBP α bloquea este proceso (Lin and Lane, 1992). C/EBP α se une y transactiva a muchos genes relacionados con el fenotipo adipogénico como son: aP2/FABP, SCD1 (*stearoyl-Coa desaturase 1*), GLUT4, PEPCK, leptina y el receptor de insulina. También es conocida su función antimitótica (Umek et al., 1991; Timchenko et al., 1997; Lin et al., 1993).

Los animales que presentan una delección del gen C/EBP α en homocigosis muestran una reducción muy importante en la acumulación de grasa de los depósitos del TAB y TAM (Wang et al., 1995). Estos ratones mueren de hipoglucemia severa el primer día como consecuencia de la incapacidad de realizar gluconeogénesis en el hígado. La reducción de adiposidad parece ser el resultado de una lipogénesis disminuida, ya que los marcadores de diferenciación adipocitaria están expresados en los distintos depósitos grasos de estos animales. La introducción del transgen C/EBP α en el hígado de estos ratones aumenta su supervivencia y aunque continúan presentando una ausencia de tejido adiposo blanco, el tejido adiposo marrón de estos ratones no se ve disminuido, sino más bien hipertrofiado (Linhart et al., 2001).

ADD1/SREBP1 .-

ADD1/SREBP1 (*adipocyte differentiation and determination factor 1/sterol regulatory element binding protein 1*) se clonó independientemente como un factor característico de la célula adiposa que se une a elementos de respuesta caja E (Kim et al., 1995; Tontonoz et al., 1993) y como un componente del hígado que se une a elementos de respuesta a esteroides (SREs o *sterol response element*) de genes que regulan el metabolismo del colesterol (Brown and Goldstein, 1997). ADD1/SREBP1 se induce durante la adipogénesis y se regula por procesos de ayuno y realimentación *in vivo* (Kim et al., 1998a; Kim and Spiegelman, 1996). Lo más probable es que la inducción de ADD1/SREBP1 durante la realimentación esté mediada por la insulina, ya que la insulina modula la expresión de ADD1/SREBP1 en adipocitos en cultivo. La forma entera de este factor de transcripción es una molécula inactiva que se une a la membrana del retículo endoplasmático. Una depleción de esteroides en la célula da lugar al corte proteolítico, translocación al núcleo y actividad transcripcional de las SREBPs en el hígado, pero cómo se activa ADD1/SREBP1 en el adipocito está aún por determinar. Lo que está claro es que ADD1/SREBP1 puede regular varios genes relacionados con el metabolismo de los ácidos grasos y triacilglicéridos, como son la FAS, la ACO y la glicerofosfato aciltransferasa 1 y 2. El hecho que al menos algunos de estos genes se encuentran fuertemente regulados en paralelo con ADD1/SREBP1

sugiere que este factor es un enlace entre los cambios nutricionales y el programa genético lipogénico de la célula.

Adicionalmente, ADD1/SREBP1 puede regular el proceso de adipogénesis, aunque no de manera tan importante como PPAR γ o C/EBP α . La expresión ectópica de ADD1/SREBP1 induce la diferenciación de la célula adiposa, probablemente induciendo directamente la expresión del gen PPAR γ a través de la unión de este factor a elementos de respuesta caja E en el promotor de PPAR γ (Fajas et al., 1999). Además se ha demostrado que una construcción dominante- negativa de ADD1/SREBP1 bloquea la diferenciación de las células 3T3-L1 (Kim and Spiegelman, 1996). Es interesante destacar que medio condicionado de células que expresan ADD1/SREBP1 es capaz de activar la transcripción mediada por PPAR γ (Kim et al., 1998b), sugiriendo que ADD1/SREBP1 está también implicado en la producción del ligando endógeno de PPAR γ .

PPAR γ .

El receptor activado por proliferadores peroxisomales γ (**PPAR γ**) es un miembro de la superfamilia de receptores nucleares de hormonas y como la mayoría de los factores de transcripción de este tipo, PPAR γ necesita heterodimerizar con otro receptor nuclear de hormona, el receptor X de retinoides o RXR, para unirse al DNA y ser transcripcionalmente activo. El gen PPAR γ da lugar a dos isoformas proteicas, PPAR γ_1 y PPAR γ_2 , generadas a partir de diferentes inicios de transcripción y *splicing* alternativo (Mukherjee et al., 1997). Mientras que PPAR γ_1 se expresa poco y en un espectro amplio de tejidos, PPAR γ_2 se expresa en grandes cantidades en el tejido adiposo y se relaciona mucho más con el metabolismo lipídico (Mukherjee et al., 1997). El receptor nuclear PPAR γ , de todos los PPARs, es el más adipogénico y ya se expresa en la etapa del preadipocito. Líneas fibroblásticas infectadas con retrovirus que expresan PPAR γ y bajo condiciones adipogénicas, se diferencian a adipocitos (Tontonoz et al., 1994). *In vivo*, se ha observado que aunque los ratones deficientes en el gen PPAR γ mueren de manera prematura durante el desarrollo, PPAR γ es necesario para el desarrollo del tejido adiposo (Barak et al., 1999), y en la diferenciación adipocitaria de células fibroblásticas de origen embrionario en cultivo (Kubota et al., 1999b) y células madres procedentes de estos ratones (Rosen et al., 1999).

PPAR γ juega un papel crucial en la función de la mayoría, sino de todos, los genes específicos de célula adiposa. La unión de PPAR γ a los *enhancers* de los genes aP2/FABP y PEPCK es absolutamente necesaria para la función de estos genes en células adiposas en cultivo (Tontonoz et al., 1995). Este análisis para el gen de la PEPCK es extensible *in vivo*, donde la activación de este promotor en el tejido adiposo

Introducción

es dependiente del lugar de unión a PPAR γ , mientras que en otros tejidos no lo es (Devine et al., 1999).

Los miembros de la superfamilia de receptores nucleares de hormonas son factores de transcripción dependientes de la activación por ligando y PPAR γ no es una excepción. PPAR γ puede ser activado por compuestos sintéticos llamados tiazolidindionas (TZDs), como la troglitazona, la pioglitazona y la rosiglitazona (BRL49653), que se usan en la clínica como agentes antidiabéticos (Lehmann et al., 1995). Estos compuestos se desarrollaron como fármacos potenciales para el tratamiento de la hiperlipemia y la resistencia a la insulina, sin que se supiera su mecanismo de acción; fue más tarde cuando se descubrió su relación con PPAR γ . Las TZDs actúan disminuyendo la hiperglicemia y hiperinsulinemia, y aumentan la sensibilidad a la insulina en el tejido adiposo, hígado y músculo esquelético. A nivel del tejido adiposo, las TZDs aumentan la sensibilidad a la insulina, se cree que estimulando la diferenciación adipocitaria y por lo tanto produciendo adipocitos más pequeños y sensibles a la hormona. El TAB sería su marco de actuación principal, donde se vehicularía la respuesta gracias a la gran expresión de PPAR γ en este tejido.

Como se esperaría para un ligando de PPAR γ , el tratamiento de preadipocitos con TZDs incrementa el grado y la tasa de adipogénesis (Sandouk et al., 1993; Kletzien et al., 1992). Esto ocurre *in vivo* e *in vitro*, aunque aún no está del todo claro si el potencial adipogénico de estos compuestos está relacionado con su capacidad antidiabética.

Aunque las TZDs resultan muy útiles como herramientas para la investigación básica y para la terapia de la resistencia a la insulina, aún no se ha conseguido descubrir ningún ligando endógeno de PPAR γ con características fisiológicas relevantes. De hecho, la búsqueda de dichos compuestos ha llevado a la identificación de algunos ligandos naturales, incluyendo la 15 deoxi- $\Delta^{12,14}$ prostaglandina J₂ o 15dPGJ₂ (Forman et al., 1995; Kliewer et al., 1995). Este eicosanoide es capaz de unirse y activar PPAR γ y puede promover adipogénesis cuando se añade a fibroblastos en cultivo. Otros ácidos grasos naturales, como el ácido oleico y linoleico, pueden unirse igualmente a PPAR γ (Forman et al., 1997; Kliewer et al., 1997).

La distribución específica de ligandos a nivel de los diferentes tejidos también puede determinar la función de PPAR γ . De esta manera, la disponibilidad de ligandos naturales procedentes de la dieta o liberados por una situación hormonal determinada y, por tanto, indicadores del marco celular específico, provocará una respuesta mediada por PPAR γ mucho más sensible y específica de tejido.

RXR.-

RXR (receptor X de retinoides) es otro miembro de la familia de receptores nucleares de hormonas. Tiene tres isoformas α , β y γ , con expresión diferencial en diferentes tejidos. Así, en el TAM se expresa preferentemente $RXR\gamma$ y en el TAB $RXR\alpha$ (Villarroya et al., 1999). Como muchos otros receptores nucleares de hormonas, el receptor RXR forma dímeros consigo mismo (homodímeros) o heterodimeriza con otros miembros de la familia de receptores. La capacidad de RXR de heterodimerizar con diversidad de receptores, incluso de ligando desconocido, permite a RXR actuar en multitud de vías como integrador de señal. La acción adipogénica de $PPAR\gamma$ se ve modulada por la capacidad transactivadora del heterodímero formado por $PPAR\gamma$ y RXR (Mukherjee et al., 1997). El receptor RXR une al ligando natural ácido 9-cis retinoico (Devine et al., 1999), aunque el significado biológico de esta unión es poco claro dados los bajos niveles de este derivado *in vivo*. El 9-cis retinoico, sin embargo, es también capaz de unirse a otro tipo de receptores nucleares, los receptores de ácido retinoico o RAR. El papel del ligando de RXR en el proceso de activación transcripcional parece depender de su papel en la formación de dímeros. Así, cuando homodimeriza o heterodimeriza con RXR o PPAR se mantiene sensible a la acción de ligando, mientras que cuando heterodimeriza con el receptor de T_3 o el receptor de la vitamina D (VDR) se cree que juega un papel de *partner* necesario pero insensible al ligando (Mangelsdorf and Evans, 1995; Li et al., 2002).

En los últimos años se ha demostrado que los ligandos sintéticos específicos del receptor RXR tienen efectos en el tratamiento de alteraciones metabólicas, como la diabetes mellitus de tipo II, efectos similares a los producidos por las TZDs. Varios estudios *in vitro* han mostrado que el tratamiento con agonistas específicos RXR de células precursoras potencia la diferenciación de la célula adiposa blanca y marrón (Schulman et al., 1998; Tontonoz et al., 1997; Schluter et al., 2002b; Schluter et al., 2002a).

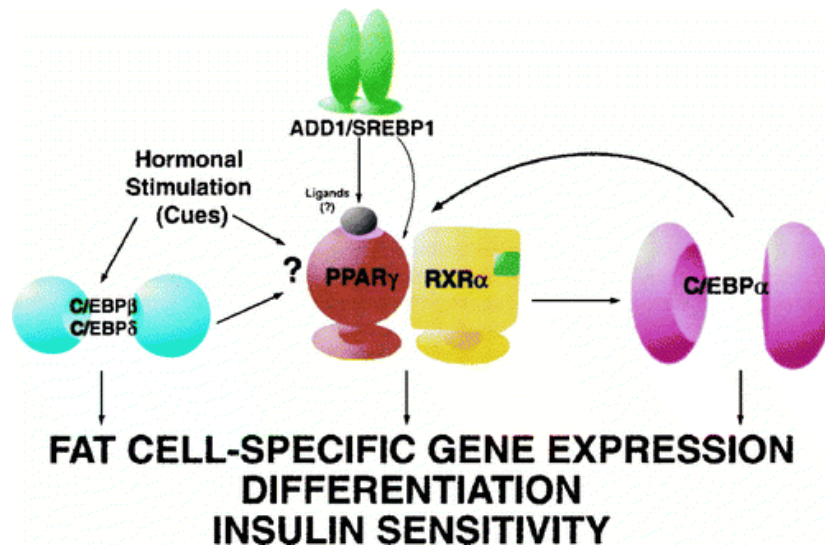


Figura 2. El control transcripcional de la adipogénesis implica la activación de una variedad de factores de transcripción. Abreviaturas: C/EBP, CCAAT/enhancer binding protein; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; SREBP-1/ADD-1, sterol regulatory element binding protein/adipocyte differentiation and determination factor 1; RXR, retinoid-X-receptor

II.1.1.2.3. Factores que estimulan la adipogénesis .-

El destino de los preadipocitos dependerá de las señales prodiferenciadoras y antidiferenciadoras que determinarán que dichas células se mantengan quiescentes, se dividan o se diferencien. (**Figura 3**)

Insulina y IGF-1 .-

La **insulina** es una hormona anabólica que induce potentemente el almacenamiento de lípidos en el tejido adiposo, pero que además actúa como un potente factor de crecimiento. La insulina favorece la acumulación de lípidos no sólo a través de la estimulación de la captación de glucosa y de incrementar la actividad de la LPL, sino también mediante la inhibición de la lipólisis inducida por catecolaminas. En experimentos con líneas celulares, la insulina actúa como un modulador positivo del proceso de diferenciación adipocitaria (Hauner et al., 1989; Wiederer and Loffler, 1987). Por el contrario, el efecto de promoción del crecimiento por parte de la insulina, a concentraciones suprafisiológicas, podría llevarse a cabo a través de la activación del receptor del **IGF-1** (*insulin-like growth factor 1*).

La activación del receptor de IGF-1 (IGF-1R) en preadipocitos estimula la adipogénesis. Las señales adipogénicas del IGF-1R actúan principalmente a través del sustrato del receptor de insulina 1 (Miki et al., 2001) y IRS-2 que activan la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3-K) (Miki et al., 2001), la actividad de la cual es necesaria para el proceso de diferenciación (Miki et al., 2001; Xia and Serrero, 1999; Sakaue et al., 1998).

Por otro lado, aún no se sabe si la p38MAPK (*p38 mitogen activated protein kinase*) juega algún papel en la señal adipogénica inducida por el IGF-1R. La insulina activa las quinasa dependientes de p38 en adipocitos maduros (Sweeney et al., 1999), la actividad de p38 es necesaria para el proceso de adipogénesis y la activación de p38 induce la diferenciación espontánea de preadipocitos (Engelman et al., 1999).

Factor estimulador de colonias de macrófagos (MCSF) .-

El **MCSF** es un factor de crecimiento que se encuentra en preadipocitos y adipocitos y que estimula la adipogénesis *in vivo* e *in vitro*. La producción de MCSF en el tejido adiposo se incrementa de manera significativa en situaciones de ingesta aumentada y disminuye rápidamente, *in vitro*, después de la exposición a la citoquina antiadipogénica TNF- α , indicando que el MCSF estaría jugando un papel fisiológico en la inducción del proceso de hiperplasia del adipocito (Levine et al., 1998).

Ácidos grasos y prostaglandinas .-

La ingesta de una dieta rica en grasa, particularmente una dieta rica en ácidos grasos saturados, induce una hipertrofia e hiperplasia del tejido adiposo. Sin embargo, hasta qué punto los **ácidos grasos** son capaces de afectar la diferenciación *de novo* de los adipocitos, es un hecho aún desconocido. Los ácidos grasos poliinsaturados, que son menos efectivos en incrementar el número de adipocitos *in vivo*, son mucho más efectivos en estimular la diferenciación de preadipocitos en cultivo que los ácidos grasos saturados (Gaillard et al., 1989; Diascro, Jr. et al., 1998), un efecto que se presume estar mediado por la habilidad de los ácidos grasos poliinsaturados de actuar como ligandos o precursores de ligandos de PPAR γ . En contra del efecto general de los ácidos grasos poliinsaturados, las **prostaglandinas** tienen un efecto altamente específico en la diferenciación del preadipocito. La prostaciclina (PGI $_2$) es un metabolito del ácido araquidónico en el tejido adiposo y estimula la adipogénesis uniéndose al receptor IP de membrana de los preadipocitos, que activa la adenilato ciclasa. El consecuente aumento de AMPc intracelular induce rápidamente C/EBP β y C/EBP δ (Aubert et al., 2000). Además, la PGI $_2$ puede estimular la diferenciación adipocitaria gracias a su habilidad de actuar como ligando de PPAR γ (Brun et al., 1996). Los adipocitos secretan grandes cantidades de angiotensinógeno, un precursor de la

angiotensina, que además de su papel como vasoconstrictor, promueve el proceso adipogénico mediante la estimulación de la secreción de PGI₂ de los adipocitos (Ailhaud, 1999).

Glucocorticoides.-

Los **glucocorticoides** son potentes inductores de adipogénesis *in vitro* y un hipercorticosteroidismo está asociado a adiposidad visceral *in vivo*. Los receptores de glucocorticoides se expresan en preadipocitos humanos primarios (Joyner et al., 2000), en preadipocitos de varias líneas celulares establecidas y los glucocorticoides activan la expresión de C/EBP δ (Cao et al., 1991) y PPAR γ (Wu et al., 1996). El enzima 11 β -HSD1 (*11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1*), que cataliza la conversión de la cortisona inactiva a la forma activa cortisol y por lo tanto sensibiliza a los tejidos a la acción de los glucocorticoides, se encuentra en preadipocitos primarios y en adipocitos. La síntesis de 11 β -HSD1 está significativamente incrementada durante la diferenciación de líneas celulares de preadipocitos (Napolitano et al., 1998), probablemente mediante activación transcripcional de C/EBP α (Williams et al., 2000). Adicionalmente, la obesidad está asociada con un incremento de 11 β -HSD1 en el tejido adiposo de roedores y humanos (Livingstone et al., 2000; Rask et al., 2001). Las células del estroma vascular de la grasa omental expresan altos niveles de actividad de la 11 β -HSD1 y, aunque los niveles de cortisol en plasma de pacientes obesos no son significativamente altos, el cortisol generado por los preadipocitos y adipocitos del depósito omental podrían actuar de manera paracrina estimulando la diferenciación adipocitaria y así promoviendo la obesidad abdominal (Bujalska et al., 1997).

II.1.1.2.4. Factores que inhiben la adipogénesis.-

Las señales que reprimen la diferenciación del adipocito son igualmente importantes para determinar el destino de los preadipocitos. Se han descrito una gran variedad de agentes y factores que inhiben el proceso de la adipogénesis. (**Figura 3**)

Ácido retinoico.-

El **ácido retinoico (RA)** se obtiene de la dieta como derivado de la vitamina A, por oxidación enzimática del retinol. Durante varios años, la capacidad del ácido retinoico de afectar varios procesos de diferenciación, incluyendo las fases terminales de la diferenciación del adipocito, ha sido ampliamente reconocida. Cuando se usa en concentraciones suprafisiológicas, el RA inhibe la diferenciación adipocitaria de líneas celulares y de preadipocitos primarios de cerdo (Dimaculangan et al., 1994; Suryawan and Hu, 1997). Ha sido ampliamente demostrado que el RA actúa en las fases

tempranas del proceso de diferenciación ya que sólo es capaz de bloquear la diferenciación cuando es añadido en estadios tempranos del proceso (juntamente con los inductores adipogénicos), mientras que si las células ya han llegado a los estadios finales de diferenciación, el tratamiento con RA ya no es efectivo (Stone and Bernlohr, 1990; Klein et al., 2000b). Este hecho se corrobora con las observaciones de que el tratamiento con RA previene la inducción de C/EBP α e interfiere con los mecanismos que inducen, a la vez que mantienen la expresión de PPAR γ . Además, investigaciones recientes indican que el efecto inhibitorio del ácido retinoico ocurre antes de la expresión de PPAR γ , mediante el bloqueo de la inducción de C/EBP β (Schwarz et al., 1997). Estas acciones del RA parecen estar mediadas principalmente por los receptores RARs, más que por RXR (Chawla and Lazar, 1994; Klein et al., 2000b).

Contrariamente al efecto inhibitorio del RA a concentraciones suprafisiológicas, concentraciones cercanas a la constante de disociación del receptor actúan como un potente inductor de diferenciación en células Ob17 y preadipocitos de rata (Safonova et al., 1994). Recientemente, se ha descrito que el pretratamiento de células ES embrionarias con ácido retinoico durante un corto período de tiempo, resulta en un alto nivel de diferenciación, indicando que el RA podría jugar un papel crítico en el proceso de diferenciación adipocitaria (Dani et al., 1997). En este caso, el papel del RA en los estadios tempranos del proceso de diferenciación es distinguible del papel del mismo sobre la diferenciación terminal del adipocito descrita anteriormente, ya que ni las hormonas adipogénicas ni los potentes activadores de PPAR γ podrían sustituir al ácido retinoico (Dani et al., 1997; Vernochet et al., 2002).

Factor preadipocitario 1 (Pref-1).-

Pref-1 es un inhibidor de la diferenciación adipocitaria (Sul et al., 2000) y se sintetiza como una proteína de membrana plasmática que contiene seis repeticiones de EGF en el dominio extracelular. Este dominio extracelular es proteolizado y da lugar a dos productos solubles de 50 y 25 kDa. Pref-1 se expresa abundantemente en preadipocitos 3T3-L1 y dicha expresión va disminuyendo a lo largo del proceso de diferenciación, hasta niveles indetectables en células maduras. Sólo la forma de 50 kDa es capaz de inhibir la diferenciación (Mei et al., 2002). La dexametasona, un agente diferenciador agonista de glucocorticoides, inhibe la transcripción de Pref-1 promoviendo así la adipogénesis.

Wnts.-

La familia de glicoproteínas secretadas **Wnt** actúa a través de mecanismos autocrinos y paracrinos para influenciar el desarrollo de varios tipos celulares (Cadigan and Nusse, 1997). La expresión ectópica de *wnt1* reprime potentemente la habilidad

Introducción

de los preadipocitos a diferenciarse en presencia de inductores de diferenciación (Ross et al., 2000). Tratamientos genéticos y farmacológicos que mimetizan la vía de señalización Wnt también bloquean la diferenciación (Ross et al., 2000; Aratani et al., 1987). La expresión de Wnt no afecta la inducción de C/EBP β y C/EBP δ , pero Wnt bloquea completamente la inducción de los factores de transcripción C/EBP α y PPAR γ . La inhibición de la señalización Wnt en preadipocitos induce la diferenciación espontánea de dichas células, indicando que los preadipocitos producen Wnt endógeno que inhibe potentemente la diferenciación. El mejor candidato es el gen *Wnt10b*, ya que la expresión de dicho gen es alta en preadipocitos proliferantes y confluentes y es rápidamente suprimida después de la inducción de la diferenciación (Ross et al., 2000). Adicionalmente, la expresión ectópica de Wnt10b estabiliza la β -catenina citosólica libre que es un potente inhibidor de adipogénesis. Durante el proceso de diferenciación, la síntesis de varias proteínas que participan en la señalización Wnt ven reprimidas su expresión. Por lo tanto, cuando en un preadipocito la balanza se decanta a favor del proceso de diferenciación, el preadipocito pierde su producción autoinhibidora de Wnt10b y también la capacidad de respuesta a la señal Wnt de células vecinas, mediante el bloqueo de los receptores Wnt y sus componentes de señalización. Wnt10b se encuentra en la fracción del estroma vascular del tejido adiposo, no en adipocito blanco maduro, hecho consistente con el papel de Wnt10b en el desarrollo del tejido adiposo. Por tanto, Wnt10b estaría actuando como un freno al proceso de diferenciación en preadipocitos de líneas celulares y quizás también *in vivo*.

TGF- β .

Otro potente regulador del desarrollo de la célula mesenquimal es la citoquina **TGF- β** (*transforming growth factor β*). La capacidad de estimulación de la proliferación de los preadipocitos y la inhibición de la adipogénesis *in vitro* por TGF- β exógeno está bien documentada (Choy et al., 2000). Acorde con esto, la diferenciación adipocitaria de ratones transgénicos que sobreexpresan el gen que codifica para el TGF- β está significativamente disminuida (Clouthier et al., 1997). La secreción de TGF- β activo y la capacidad de los receptores de TGF- β decrece durante la diferenciación (Choy et al., 2000), indicando que TGF- β , como Wnt, es una señal producida de manera endógena que actúa manteniendo a los preadipocitos en un estado indiferenciado.

Citoquinas inflamatorias y hormona del crecimiento .-

Las **citoquinas inflamatorias**, incluido TNF- α , interleuquina 1 (IL-1), IL-6, IL-11, el factor inhibidor de leucemia y interferon γ (IFN- γ), son inhibidores de la diferenciación adipocitaria *in vitro* y pueden jugar un papel importante en la atrofia del

tejido adiposo relacionada con la caquexia del cáncer, enfermedades de origen inflamatorio y enfermedades infecciosas crónicas (Gregoire et al., 1992; Ohsumi et al., 1994a; Ohsumi et al., 1994b). TNF- α secretado o unido a membrana inhibe la adipogénesis mediante el receptor de TNF- α de tipo 1, parcialmente activando la vía ERK (Xu et al., 1999). La exposición de preadipocitos a TNF- α u otras citoquinas inhibe la diferenciación mediante el bloqueo de la inducción de PPAR γ y C/EBP α .

La **hormona del crecimiento (GH)** se ha demostrado que reduce la adiposidad *in vivo*, probablemente mediante la activación de la lipólisis, principalmente. Sin embargo, la GH inhibe la diferenciación de preadipocitos en cultivo primario, sugiriendo que la adipogénesis *de novo in vivo* está también directamente inhibida. Por el contrario, la GH estimula la diferenciación de varias líneas celulares de preadipocitos derivadas de embriones, probablemente demostrando el estado temprano de desarrollo de estas células (Wabitsch et al., 1995). Es interesante destacar que la obesidad se correlaciona con una secreción disminuida de GH y una pérdida de peso con una secreción aumentada de la misma (Scacchi et al., 1999).

Los adipocitos totalmente diferenciados producen TNF- α y otras citoquinas inflamatorias, hecho que sugiere que, a parte de causar resistencia a la insulina, estas citoquinas podrían actuar de manera paracrina sobre los preadipocitos inhibiendo la diferenciación adipocitaria.

PGF_{2 α} .-

Contrariamente a la PGI₂, que estimula la diferenciación adipocitaria, la **prostaglandina F_{2 α} (PGF_{2 α})** inhibe la diferenciación de preadipocitos en cultivo (Serrero et al., 1992).

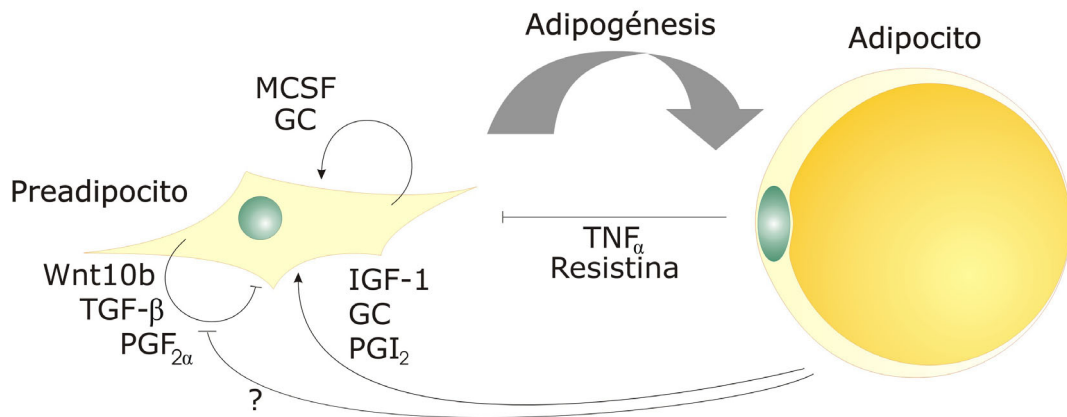


Figura 3. Señales autocrinas y paracrinas producidas por el tejido adiposo que afectan el destino de los preadipocitos. Ambos preadipocitos y adipocitos secretan factores antiadipogénicos (barras) y proadipogénicos (flechas). Los adipocitos que se hipertrofian por encima de una determinada medida, pueden incrementar las señales hacia los preadipocitos para que se dividan y diferencien. Abreviaturas: GC, glucocorticoides; IGF-1, *insulin-like growth factor-1*; MCSF, *macrophage colony-stimulating factor*; $\text{PGF}_{2\alpha}$, prostaglandina $\text{F}_{2\alpha}$; PGI_2 , prostaciclina; $\text{TGF-}\beta$, *transforming growth factor β* ; $\text{TNF-}\alpha$, *tumor necrosis factor α* .

II. 1. 2. EL TEJIDO ADIPOSO MARRÓN

II. 1. 2. 1. FUNCIÓN Y CARACTERÍSTICAS

La eutermia, o capacidad de mantener y regular la temperatura corporal, es una función fisiológica básica de los animales superiores. Son dos los principales mecanismos de generación de calor: la **termogénesis asociada a temblor**, consistente en la contracción muscular involuntaria y la **termogénesis no asociada a temblor** (Nedergaard et al., 2001). Éste último mecanismo está ligado a la actividad del **tejido adiposo marrón (TAM)**. Este tejido juega un papel crítico en el balance energético, aunque su importancia depende de la especie, la edad y el tamaño del organismo. La función termogénica del tejido adiposo marrón es fundamental para el mantenimiento de la temperatura en mamíferos de pequeña talla, en los cuales la relación superficie-volumen les es desfavorable, y durante el período neonatal y la infancia de muchas especies (Cannon and Nedergaard, 1986). En neonatos humanos, el tejido es muy abundante y presenta una gran actividad, pero su importancia va disminuyendo progresivamente con la edad. En animales adultos de otras especies la producción de calor por parte del tejido tiene una función muy importante en la adaptación a ambientes fríos, además de participar en el despertar de los animales en hibernación.

El tejido adiposo marrón se localiza en zonas muy específicas: en la región interescapular, cervical, axilar, alrededor del timo y asociado a las costillas alrededor del corazón y los riñones. Esta distribución dispersa responde a la necesidad de transferencia de calor desde el TAM a los vasos sanguíneos principales por contacto o convección. El TAM debe su color marrón a la elevada vascularización del tejido y al gran número de mitocondrias. La tasa de respiración de las mitocondrias es muy elevada y requiere un buen suministro de oxígeno, garantizado por la elevada tasa de perfusión del sistema vascular. El tejido adiposo marrón también presenta una gran inervación simpática, así como una alta densidad de receptores α y β -adrenérgicos situados cerca de las terminaciones simpáticas (Nedergaard and Cannon, 1985).

La capacidad del tejido adiposo para producir calor se debe a un desacoplamiento regulado entre la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa. Nicholls y colaboradores demostraron que el desacoplamiento de la mitocondria del TAM se caracterizaba por una vía de transporte de protones presente en la membrana mitocondrial interna de las células de este tejido (Nicholls and Locke, 1984). La activación de esta vía disipaba el gradiente electroquímico de protones generado durante la respiración mitocondrial y la energía generada se perdía en forma de calor.

Introducción

El sistema de transporte de protones se identificó como una proteína de 32kDa presente exclusivamente en el tejido adiposo marrón. Se demostró que la presencia de esta proteína en la membrana mitocondrial era elevada por exposición al frío y que su actividad era inhibida por nucleótidos de purina (Ricquier and Kader, 1976). Esta proteína recibió el nombre de **UCP** o **uncoupling protein** (Lin and Klingenberg, 1982) y es el marcador bioquímico y molecular del tejido adiposo marrón. Actualmente, dado que se han identificado nuevas proteínas con una gran similitud con UCP (ver apartado I.1.2.6) se la denomina **UCP-1** (Fleury et al., 1997).

Tanto el adipocito marrón como el adipocito blanco derivan del mesodermo y los dos tipos celulares son fundamentales para la homeostasis energética y tienen un metabolismo lipídico común, pero su funcionalidad es muy diferente. Mientras que el adipocito blanco tiene una función principalmente de reserva, el adipocito marrón participa en la termogénesis adaptativa. Un adipocito marrón diferenciado expresa UCP-1 en su membrana mitocondrial interna y se caracteriza por la presencia de gran cantidad de vacuolas lipídicas que garantizan el aporte de sustratos durante la estimulación termogénica. Cuando el tejido es activado, se incrementa la tasa lipolítica asociada a la β -oxidación principalmente mitocondrial, y en menor grado peroxisomal. La rápida movilización y oxidación de los triacilglicéridos almacenados en las vacuolas es posible gracias al elevado número de mitocondrias presentes en la célula.

Aunque aún no se ha descrito ningún factor de transcripción específico de la célula adiposa marrón, **PPAR γ** y **C/EBP α** son inducidos durante la diferenciación del adipocito marrón, de manera similar a como ocurre en el adipocito blanco. En ratones *knockout* para PPAR γ , el desarrollo del TAM se ha visto que está retardado (Barak et al., 1999). Adicionalmente, la activación de PPAR γ con TZD en líneas celulares de adipocito marrón resulta en una importante diferenciación de estas células y la administración de TZDs a roedores induce la acumulación de TAM interescapular (Tai et al., 1996). El papel de las proteínas C/EBP en la adipogénesis del TAM también parece evidente ya que ratones que carecen de C/EBP α o de **C/EBP β** y **C/EBP δ** presentan una acumulación de lípidos reducida en estas células y una expresión de UCP-1 disminuida (Tanaka et al., 1997; Wang et al., 1995). **PPAR α** también está altamente expresado en el TAM y dado que PPAR α juega un papel muy relevante en la β -oxidación de ácidos grasos en otros tejidos distintos al TAM (Dreyer et al., 1992) y que este proceso es muy importante en el tejido adiposo marrón, es bastante probable que PPAR α esté también jugando algún papel en este proceso.

El 70% del volumen del adipocito marrón está ocupado por depósitos lipídicos. Además de adipocitos, el TAM incluye células endoteliales, fibroblastos, células perivasculares, mesenquimáticas, preadipocitos, mastocitos y células de Schwan. Se

creo que las células mesenquimáticas podrían dar lugar a las células precursoras de los adipocitos.

II. 1. 2. 2. LA TERMOGÉNESIS ADAPTATIVA Y SU REGULACIÓN

La capacidad termogénica del tejido adiposo marrón depende de la temperatura ambiental, del estadio de desarrollo y de la ingesta, y estos factores influyen tanto en la cantidad de proteína desacopladora presente en la membrana mitocondrial como en su actividad y expresión en el tejido.

El principal estímulo fisiológico del tejido adiposo marrón es la **disminución de la temperatura ambiental**, que se asocia con un fuerte incremento en los niveles de UCP-1. Animales que carecen de tejido adiposo marrón o genéticamente deficientes en UCP-1, presentan deficiencias en la termogénesis y son intolerantes al frío (Enerback et al., 1997; Lowell et al., 1993).

Una exposición aguda del animal al frío provoca una rápida respuesta termogénica en el tejido adiposo marrón, se produce un incremento en la actividad del sistema nervioso simpático y un incremento del flujo sanguíneo en el tejido. Durante un estrés térmico prolongado, se produce un incremento de las divisiones celulares de los preadipocitos y un incremento de la síntesis de proteínas, específicamente UCP-1, la LPL, la yodotironina 5'-desyodasa y enzimas implicados en lipólisis (Himms-Hagen et al., 1986), acompañado por la proliferación de las mitocondrias y otros orgánulos.

El tejido adiposo marrón participa en la **termogénesis adaptativa inducida por la dieta**, regulando el peso corporal (Rothwell and Stock, 1986). La ingesta de alimentos incrementa la actividad del sistema nervioso simpático en el TAM, estimulando la actividad termogénica del tejido (Glick et al., 1981). Animales sometidos durante largos periodos de tiempo a dietas hipercalóricas presentan hipertrofia del tejido con unos niveles altos de la proteína y del mRNA de UCP-1 (Champigny and Ricquier, 1990). Asimismo, en situaciones de ayuno (Trayhurn and Jennings, 1986) o de dieta hipocalórica (Villarroya et al., 1986a) se produce una disminución de los niveles de UCP-1. Otras evidencias de la implicación del tejido adiposo marrón en la termogénesis adaptativa inducida por la dieta se obtienen de estudios realizados con diferentes cepas de ratones genéticamente obesos, como los ratones ob/ob, deficientes en el gen de la leptina, que presentan la actividad simpática del TAM disminuida.

En humanos, un polimorfismo en la región promotora de *ucp-1*, generado por una mutación puntual A/G, se encuentra asociado a obesidad (Oppert et al., 1994). A

este polimorfismo se le considera un factor de predicción asociado al incremento de peso durante la vida adulta en individuos con obesidad y a la dificultad de disminuir peso bajo regímenes hipocalóricos (Clement et al., 1996; Fumeron et al., 1996). Todos estos estudios sugieren que la proteína UCP-1 participa en el balance energético y en el mantenimiento del peso corporal en humanos, aunque la presencia de adipocitos marrones en los humanos es escasa (ver apartado I.1.2.3).

Clásicamente, se ha considerado a la noradrenalina (NA) la principal vía de regulación de la actividad termogénica del TAM, mediante el control de la expresión de UCP-1, pero la actividad de esta proteína viene modulada por otros factores que actúan de manera independiente o conjunta con la NA (**Figura 4**). La regulación de UCP-1 depende de las exigencias termogénicas del organismo, además de que está ligada al grado de diferenciación del tejido y de una expresión exclusiva en el adipocito marrón.

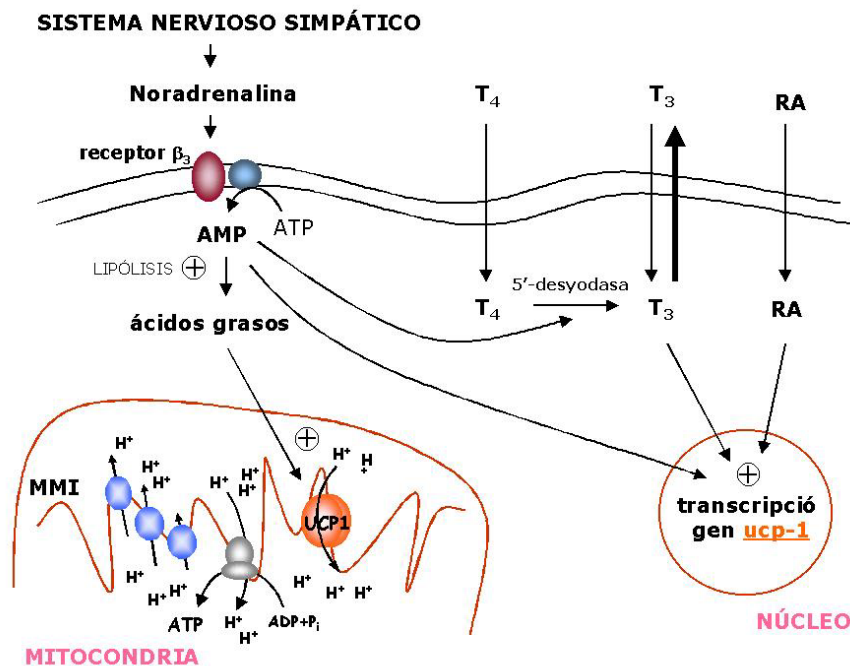


Figura 4. Esquema de las principales vías implicadas en la regulación de la actividad termogénica del tejido adiposo marrón.

II.1.2.2.1. REGULACIÓN POR NORADRENALINA.-

La capacidad de un adipocito marrón de producir calor depende de la actividad de la proteína UCP-1 y de la vía de degradación de triacilglicéridos. La **activación noradrenérgica** del tejido de manera aguda genera un incremento en el AMPc intracelular, provocado por la unión de la NA a sus receptores. En adipocitos maduros, este incremento produce una activación de la adenilato ciclasa que da lugar a una estimulación de la actividad de la lipasa sensible a las hormonas (HSL) y al correspondiente aumento de los ácidos grasos libres. Estos ácidos grasos por un lado estimulan directamente la actividad de la proteína desacopladora UCP-1 presente en la mitocondria, y por el otro, sirven de sustrato en la oxidación mitocondrial. Cuando la estimulación del tejido por la NA es crónica, se incrementan el contenido de UCP-1 en las mitocondrias de los adipocitos maduros, se produce hiperplasia del tejido y diferenciación del *pool* de células precursoras. La noradrenalina actúa modificando la transcripción de diversos genes, entre ellos *ucp-1* y la expresión de factores de transcripción relacionados con diferenciación y proliferación (Nedergaard et al., 1995).

En adipocitos marrones, la noradrenalina interactúa con los tres receptores adrenérgicos: β , α_1 y α_2 , receptores que están asociados con distintas vías de señalización en el adipocito marrón.

El adipocito marrón expresa los tres subtipos de **receptores β -adrenérgicos**, β_1 , β_2 y β_3 pero la participación en la respuesta termogénica se restringe a los receptores β_1 y β_3 -adrenérgico. La vía de transducción de señal de los dos subtipos está ligada a un incremento de los niveles de AMPc, a través de la estimulación de la adenilato ciclasa mediante proteínas Gs, y su expresión en la célula se relaciona con el grado de diferenciación del adipocito. Los **receptores β_3 -adrenérgicos** son los más significativos en adipocitos marrones maduros ya que participan en la respuesta a la estimulación aguda y crónica del tejido. El incremento en los niveles de AMPc por la activación del receptor β_3 -adrenérgico da lugar a la activación de la proteína quinasa A (Linhart et al., 2001). Por un lado, la PKA activa es capaz de activar la HSL, dando lugar a un incremento en la lipólisis y una consecuente activación de la termogénesis (revisión Cannon and Nedergaard, 2004). Por otro lado, la PKA fosforila al factor de transcripción CREB (proteína de unión a CRE) (Thonberg et al., 2002) que activa la expresión de *ucp-1* (Ricquier et al., 1986; Kopecky et al., 1990; Rehnmark et al., 1990) (ver apartado I.1.2.5.3), así como aumenta la expresión de genes relacionados con la diferenciación (Rehnmark et al., 1993; Puigserver et al., 1998; Nedergaard et al., 1995). Los **receptores β_1 -adrenérgicos** están involucrados en el fuerte incremento en la división celular que se observa en tejido adiposo marrón expuesto al

frío. En los preadipocitos, que expresan los receptores β_1 -adrenérgicos, pero no los β_3 , la activación adrenérgica del tejido a través de los receptores β_1 estimula la proliferación y provoca hiperplasia del tejido (Bronnikov et al., 1992).

El adipocito marrón también expresa los dos subtipos de **receptores α -adrenérgicos**, α_1 y α_2 . La activación de los **receptores α_2 -adrenérgicos** estimula la proteína G_i , inhibiendo la adenilato ciclasa y atenuando así los niveles de AMPc producidos durante la estimulación simpática del tejido. El incremento de los niveles de AMPc dependerá del balance entre la expresión de los receptores y el tipo de adenilato ciclasa presente en la membrana de la célula. La estimulación de los **receptores α_1 -adrenérgicos** produce un incremento en la producción de inositol-trifosfato (Nanberg and Nedergaard, 1987) y un aumento en los niveles de calcio intracelular (Wilcke and Nedergaard, 1989). El número de receptores α_1 aumenta en situaciones de aclimatación al frío y bajo determinadas dietas y se ha demostrado que la activación simultánea de los receptores β y α_1 -adrenérgicos tiene como resultado un incremento en el efecto producido por el AMPc (Raasmaja et al., 1984).

PGC-1 α y la termogénesis adaptativa.-

PGC-1 α o coactivador del receptor activado por proliferadores peroxisomales γ (PPAR γ) -1 α , es un coactivado recientemente identificado que se ha demostrado que está implicado en múltiples respuestas biológicas relacionadas con la homeostasis energética, la regulación térmica y el metabolismo de la glucosa. Es una proteína de 90kDa que se expresa en músculo esquelético, corazón, riñón, cerebro y tejido adiposo marrón, pero no en el tejido adiposo blanco, en roedores (Puigserver et al., 1998).

Un coactivador es una proteína o conjunto de proteínas que mediante la interacción con factores de transcripción, incrementa la tasa de transcripción de determinados genes, ejerciendo este efecto sin que se una a ninguna secuencia específica del DNA. Así, PGC-1 α es capaz de coactivar, entre otros, varios receptores nucleares, como los PPARs o el receptor de la hormona tiroidea (TR) (Puigserver et al., 1998), regulando así la expresión de numerosos genes.

La función de los receptores adrenérgicos en el TAM y en el músculo esquelético es crítica para la respuesta de estos tejidos al frío y a alteraciones en la dieta. En este sentido, se ha observado que PGC-1 α se induce considerablemente, a nivel transcripcional, en el tejido adiposo marrón y en músculo esquelético de ratones expuestos al frío. Consistente con estos datos *in vivo*, el mRNA de PGC-1 α se induce en líneas celulares de adipocito marrón tratadas con el agonista β -adrenérgico, isoproterenol (Puigserver et al., 1998). Este efecto está mediado por receptores β_3 -adrenérgicos, ya que animales deficientes en este tipo de receptor carecen de la inducción de PGC-1 α por el frío en el TAM (Boss et al., 1999). Además, inyecciones con

un agonista β_3 específico inducen específicamente la expresión de PGC-1 α en el TAM (Gomez-Ambrosi et al., 2001).

Como ya se mencionó anteriormente, PGC-1 α coactiva varios receptores nucleares de hormonas, entre ellos los receptores nucleares que se unen al promotor de *ucp-1* y que modulan su expresión. De esta manera se ha propuesto que parte del efecto del AMPc sobre la regulación transcripcional de *ucp-1* está mediada a través de la inducción de PGC-1 α y la subsiguiente interacción de éste con los receptores nucleares de hormonas PPAR γ , PPAR α , RAR y TR (ver apartado I.1.2.5.3).

La introducción de PGC-1 α en células adiposas 3T3-F442A en cultivo induce la expresión de UCP-1 y de enzimas mitocondriales clave de la cadena respiratoria, así como estimula un incremento en la cantidad de mtDNA (Puigserver et al., 1998). Cuando se introduce PGC-1 α en células musculares, se induce de manera muy importante la expresión de NRF-1, NRF-2 y TFAM, factores de transcripción clave en la biogénesis y función mitocondrial (ver apartado I.1.3.3) (Wu et al., 1999a).

Simultáneamente a los efectos de PGC-1 α sobre la respiración mitocondrial en células de músculo esquelético, este coactivador también induce la expresión del transportador de glucosa sensible a la insulina (GLUT4) e incrementa la captación de glucosa (Michael et al., 2001). Además, el tratamiento de células musculares con diversas citoquinas activa la actividad transcripcional de PGC-1 α , mediante la fosforilación directa de la p38MAPK, causando un incremento en la expresión de genes ligados al desacoplamiento mitocondrial y al gasto energético (Puigserver et al., 2001).

Una de las cuestiones clave sobre la función de PGC-1 α es si este coactivador es el que determina que un preadipocito se convierta en adipocito marrón y no blanco (**Figura 5**). Existen varias observaciones que apuntan que PGC-1 α estaría involucrado en esta decisión. Primero, PGC-1 α es la única proteína descrita hasta el momento capaz de activar potentemente la expresión de UCP-1 en líneas celulares sin relación con el TAM (Puigserver et al., 1998). Después, cuando se introduce PGC-1 α en células adiposas blancas, éste induce la expresión endógena de UCP-1 y activa la biogénesis mitocondrial, ambas características típicas del adipocito marrón (Tiraby et al., 2003). Por último, PGC-1 α está regulado por la activación de receptores β -adrenérgicos y AMPc intracelular, agentes que se sabe que inducen la expresión de UCP-1 y la hipertrofia del tejido adiposo marrón.

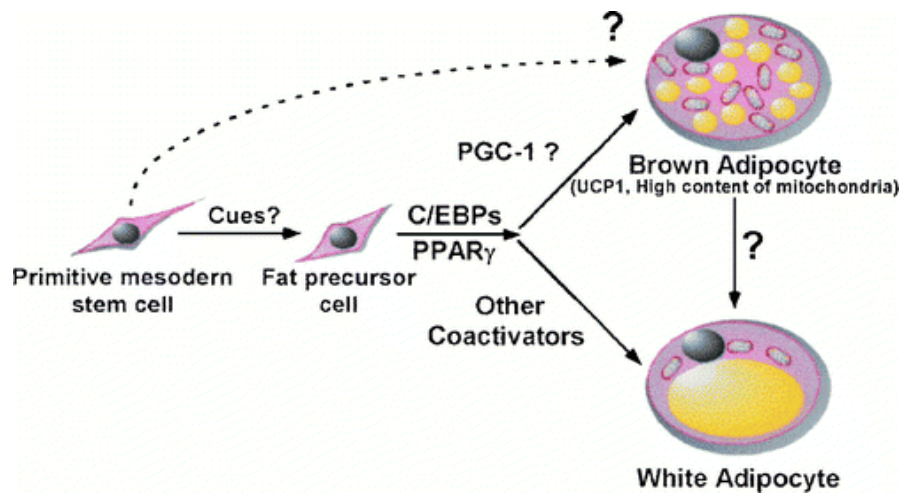


Figura 5. Control transcripcional del destino de la célula adiposa. Los preadipocitos pueden diferenciarse potencialmente a adipocito blanco o adipocito marrón. La activación PPAR γ /RXR α es requisito indispensable para la diferenciación de ambas células adiposas. A partir de este momento, la presencia de distintos coactivadores determinará la diferenciación hacia un tipo celular u otro. La actuación del coactivador PGC-1 α puede activar la expresión génica asociada con la conversión de preadipocito a adipocito marrón. Si existe una conversión entre adipocitos marrones y adipocitos blancos es algo aún desconocido.

II.1.2.2.2. REGULACIÓN POR HORMONAS TIROIDEAS .-

El tejido adiposo marrón contiene el enzima yodotironina 5'-desyodasa (tipo II) (Bianco and Silva, 1987) y su actividad es elevada, por lo tanto, el TAM es capaz de generar su propia **hormona tiroidea** activa (3,5,3'-triyodotironina, **T₃**), a partir de tiroxina (T₄). En ciertas ocasiones este tejido puede ser una importante fuente de hormona que se libera en sangre (Fernández et al., 1987). De esta forma, el TAM puede influenciar el estado termogénico de otros órganos que carecen de capacidad de generar su propia T₃.

La hormona tiroidea es necesaria para la termogénesis inducida por el frío que se da en el tejido adiposo marrón. De hecho, animales hipotiroideos mueren al ser expuestos a bajas temperaturas. Además, la T₃ actúa de forma sinérgica con la noradrenalina a diferentes niveles: en la activación de la adenilato ciclasa, en el efecto del AMPc sobre la lipólisis y en la acción termogénica de los ácidos grasos sobre la mitocondria (Ross et al., 1992).

El efecto del frío sobre la acción de la yodotironina 5'-desyodasa está mediado por receptores α_1 y β -adrenérgicos (Raasmaja and Larsen, 1989). Como consecuencia de una activación simpática, aumenta la actividad del enzima debido a un incremento

en la síntesis del mismo. Así, la hormona T₃ producida en estas condiciones es suficiente para saturar sus receptores nucleares y activar, junto con la noradrenalina, la expresión de *ucp-1* (Bianco and Silva, 1987; Rehnmark et al., 1990; Hernández and Obregon, 2000), al unirse a sus elementos de respuesta en el promotor de este gen (Cassard-Doulier et al., 1994; Rabelo et al., 1995; Rabelo et al., 1996b) (ver apartado I.1.2.5.3).

II.1.2.2.3. REGULACIÓN POR ÁCIDO RETINOICO .-

Como ya se mencionó anteriormente, el **ácido retinoico** participa en la diferenciación y proliferación celular de diversos tejidos de mamífero y en morfogénesis (De Luca, 1991; Leid et al., 1992). El **9-*cis* RA** y el ***all-trans* RA** son los principales isómeros del ácido retinoico con funcionalidad biológica. La mayor parte de las células pueden disponer de los dos isómeros por interconversión enzimática de un isómero a otro (Mangelsdorf, 1994).

El ácido retinoico actúa modificando a nivel transcripcional la expresión de sus genes diana, a través de la activación de los factores de transcripción dependientes de ligandos, los receptores de retinoico. Estos receptores pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares y se clasifican en dos subfamilias: los **RAR** y los **RXR**. Los isómeros presentan una afinidad específica para cada uno de los receptores: *all-trans* RA realiza sus efectos a través de RAR gracias a la formación de el heterodímero RAR/RXR y el 9-*cis* RA está considerado como un "pan-agonista" ya que se une tanto a receptores RAR como RXR. Así el 9-*cis* RA activa los heterodímeros RAR/RXR, los heterodímeros RXR/RXR y aquellos heterodímeros en los que uno de los monómeros sea RXR y el otro algún miembro de la superfamilia de receptores nucleares de hormonas, como los PPARs (revisión Villarroya et al., 2004).

Tanto el TAM como el TAB participan de forma activa, conjuntamente con el hígado, en la homeostasis de los retinoides y son tejidos diana de su actividad. El tejido adiposo representa el 15-20% del total del almacenaje de retinoides corporal (Tsutsumi et al., 1992), reserva que se encuentra mayoritariamente en forma de retinol (Tsutsumi et al., 1992). El retinol que llega a la célula adiposa proviene principalmente del hígado, la célula lo capta y lo transforma en 9-*cis* o *all-trans* RA. El tejido adiposo presenta una elevada expresión de las proteínas implicadas en el metabolismo de los retinoides, la CRBP (*cytoplasmatic retinol-binding protein*) y la RBP (*retinol-binding protein*). Se ha comprobado que in vitro, los adipocitos marrones y blancos pueden sintetizar RBP y la secretan al medio de cultivo (Tsutsumi et al., 1992), además de que el retinol puede ser movilizado por los adipocitos (Wei et al.,

1997). Estos datos sugieren que los tejidos adiposos están involucrados no sólo en el almacenaje sino también en la movilización y transporte de los retinoides, regulando así su homeostasis. Por otro lado, los tejidos adiposos también contienen ácido retinoico que deriva de la propia síntesis local (Kurlandsky et al., 1995) y a concentraciones similares a las del hígado y otros tejidos que responden al ácido retinoico. Por lo tanto, considerando la masa total de los tejidos adiposos, éstos pueden contribuir de manera importante al metabolismo del ácido retinoico.

La activación de los receptores RAR en adipocitos marrones difiere de la que se da en adipocitos blancos en el hecho que en los primeros, el ácido retinoico está activando la transcripción de *ucp-1* (Álvarez et al., 1995) (ver apartado I.1.2.5.3). El RA genera un aumento en los niveles del mRNA de UCP-1 en adipocitos marrones de ratón diferenciados en cultivo primario, independientemente del estado de diferenciación y sin causar ningún efecto en la morfología de la célula o en marcadores moleculares de diferenciación adipocitaria. Estos resultados han sido corroborados con otros estudios *in vitro* e *in vivo* (Rabelo et al., 1996a; Puigserver et al., 1996) y se han identificado elementos de respuesta al ácido retinoico en el promotor de *ucp-1* (Larose et al., 1996; Álvarez et al., 1995; Rabelo et al., 1996a; Álvarez et al., 2000). El efecto positivo del ácido retinoico sobre *ucp-1* en adipocitos marrones resulta paradójico, ya que si preadipocitos marrones se tratan con ácido retinoico en estadios tempranos de la diferenciación, se produce una supresión de la diferenciación, de igual manera que lo hace el ácido retinoico en preadipocitos blancos (Puigserver et al., 1996).

II.1.2.2.4. INSULINA Y IGF-1 .-

La **insulina** contribuye al mantenimiento de la capacidad termogénica del TAM, participa en el metabolismo del adipocito marrón estimulando la captación de glucosa y ácidos grasos y favoreciendo su oxidación, además de estar implicada en el desarrollo de la mitocondria, que como ya se ha dicho es la responsable de la capacidad termogénica del adipocito marrón.

Los datos que se tienen sobre como la insulina regula la expresión de UCP-1 son poco claros. Cepas de ratones obesos (*ob/ob*) (*db/db*) o ratas Zucker (*fa/fa*) que presentan resistencia a la insulina, manifiestan una atenuación de la actividad termogénica del TAM en situaciones de estimulación por el frío o la ingesta, aunque estos efectos podrían ser debidos a la alteración de la vía de la leptina en estos modelos de obesidad. Se ha demostrado que la insulina disminuye un 25% la estimulación β_3 -adrenérgica de *ucp-1*. La inhibición producida por la insulina es específica para la vía β_3 -adrenérgica y se cree que la insulina actuaría a través de un

mecanismo de autoinhibición en el que participaría el enzima MAPK. Los autores proponen que este mecanismo tomaría mucha importancia en situaciones de hiperinsulinemia donde se bloquearía la termogénesis del tejido, favoreciendo el desarrollo de obesidad y diabetes, tanto en humanos como en ratones (Klein et al., 2000a).

El **IGF-1** está implicado en la diferenciación del adipocito marrón y en la expresión de la proteína UCP-1 (Teruel et al., 1995). El receptor de IGF-1 se expresa constitutivamente en el TAM y el contenido de su mRNA incrementa al final del desarrollo fetal, momento en el que se da la diferenciación termogénica y adipocitaria del tejido, etapa donde el tejido también expresa el mRNA de IGF-1. Estos hechos sugieren que este factor, de manera autocrina o paracrina, tendría un posible papel en el inicio o mantenimiento de la expresión de *ucp-1* durante la diferenciación del TAM antes del nacimiento, cuando el estímulo adrenérgico aún no es funcional (Teruel et al., 1995).

II. 1. 2. 3. EL TEJIDO ADIPOSO MARRÓN EN HUMANOS

Como ya se mencionó anteriormente, los humanos presentan acumulaciones de tejido adiposo marrón, sólo en el período neonatal, donde se puede encontrar principalmente en la cavidad torácica, alrededor de los vasos sanguíneos principales. Sin embargo, resultados recientes indican que depósitos de grasa que aparentemente parecen estar constituidos por tejido adiposo blanco, presentan pequeñas isletas de tejido adiposo marrón y la utilización de la técnica de la PCR ha permitido demostrar que el mRNA de UCP-1 se detecta en tejido adiposo blanco de humanos adultos (Champigny and Ricquier, 1996). Esto sugiere que en los depósitos de tejido adiposo blanco hay, en pequeñas proporciones, adipocitos marrones. Además, humanos con feocromocitoma, una situación patológica caracterizada por una elevada activación adrenérgica, o con hibernomas, tumores de TAM, desarrollan grandes depósitos de tejido adiposo marrón y estos depósitos expresan UCP-1, indicando que la expresión de UCP-1 puede inducirse en ciertos tumores y situaciones de alteraciones metabólicas (Mar González-Barroso et al., 2000b).

Además, es interesante destacar que existe un polimorfismo en la región promotora de *ucp-1* que se ha observado que se encuentra asociado a obesidad (Oppert et al., 1994). Esto situaría 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.

II. 1. 2. 4. MODELOS DE ESTUDIO DEL TEJIDO ADIPOSO MARRÓN

II.1.2.4.1. DESARROLLO DEL TEJIDO ADIPOSO MARRÓN *IN VIVO* .-

En la mayoría de las especies, el desarrollo del TAM se da durante la vida fetal y en el momento del nacimiento ya es totalmente funcional. La adquisición de la morfología típica de los adipocitos marrones y de la capacidad termogénica depende de la diferenciación adipocitaria de la célula, con la expresión de genes característicos del metabolismo lipídico, de una diferenciación específica del tejido, con expresión de UCP-1 y de una biogénesis y diferenciación mitocondrial.

Diferenciación morfológica.-

En los últimos días de vida fetal, durante la diferenciación del TAM, se produce un aumento del tamaño de los adipocitos sin que exista apenas proliferación. En el caso del ratón, entre los días 15 de gestación y el nacimiento el peso del TAM aumenta de forma considerable, momento en el cual los adipocitos marrones presentan el tamaño y morfología que los caracterizan. El contenido lipídico también aumenta en este período siendo ya visibles cinco días antes del nacimiento (Houstek et al., 1988; Ross et al., 1992). En el caso de la rata, también se produce un incremento en el contenido lipídico durante esta etapa y es durante la primera ingesta de leche materna cuando éste aumenta considerablemente (Ross et al., 1992).

Durante el período perinatal, el TAM también tiene capacidad para acumular glucógeno, que desaparecerá como consecuencia del estrés térmico que sufrirá el recién nacido después del parto. Se cree que esta movilización de glucógeno tiene una función anaplerótica de aporte de compuestos intermediarios al ciclo del ácido cítrico (Ross et al., 1992).

El proceso de **mitocondriogénesis** también se activa durante el desarrollo perinatal del tejido: Durante los días 16 y 17 de gestación, en el ratón y la rata, respectivamente, los adipocitos presentan aún mitocondrias poco desarrolladas y alargadas. A medida que el tejido se diferencia, el número de mitocondrias, así como el de crestas de estos orgánulos, incrementan y en el momento del nacimiento el contenido mitocondrial se ha triplicado y los adipocitos presentan un citosol completamente lleno de mitocondrias totalmente desarrolladas: redondeadas y elipsoidales, con numerosas crestas dispuestas paralelamente (Houstek et al., 1988; Loncar, 1991; Ross et al., 1992).

Diferenciación de la capacidad termogénica.-

La expresión de **UCP-1** se inicia al final de la vida intrauterina en rata y en ratón (Houstek et al., 1988) (Giralt et al., 1990). A partir de ese momento, los niveles de mRNA de UCP-1 aumentan considerablemente con el desarrollo y en las primeras horas de vida extrauterina se observa una importante inducción de *ucp-1* (Giralt et al., 1990). El estrés térmico al que se encuentran sometidas las crías al nacer es lo que desencadena la fuerte respuesta termogénica del tejido para evitar el peligro que supone la hipotermia (Nicholls and Trayhurn, 1986). Este patrón de expresión es independiente de la **biogénesis mitocondrial**, la cual se inicia con anterioridad con un aumento progresivo de la expresión de los genes del sistema de la cadena respiratoria-fosforilación oxidativa (sistema OXPHOS) (Houstek et al., 1988)(Giralt et al., 1990).

Diferenciación adipocitaria.-

El adipocito marrón, como célula adiposa que es, expresa los genes necesarios tanto para el acúmulo de lípidos (lipogénesis), como para su movilización (lipólisis), genes considerados marcadores de diferenciación del adipocito. Durante el proceso de diferenciación prenatal que se da en el TAM, las células adquieren la capacidad de almacenar triacilglicéridos que posteriormente serán oxidados para producir calor, por eso, a diferencia del tejido adiposo blanco, el TAM tiene una gran capacidad de catabolizar lípidos -oxidación mitocondrial y peroxisomal.

Estudios hechos en rata de los perfiles de expresión de diversos marcadores adipocitarios en el TAM durante la etapa fetal, como la LPL, FAS o GLUT-4, indican que la mayoría aumentan sus niveles progresivamente durante los últimos días de gestación (Teruel et al., 1995; Santalucia et al., 1992) (Giralt et al., 1990).

Los factores de transcripción considerados responsables del proceso de diferenciación del adipocito marrón pertenecen principalmente a dos familias: C/EBP y PPAR. C/EBP α adquiere su máxima expresión a día 20 de vida fetal en la rata y C/EBP β y C/EBP δ tienen sus niveles más altos de mRNA justo antes del nacimiento (Teruel et al., 1995). Los receptores nucleares PPAR α , γ y δ/β son detectables en el ratón a día 18,5 de vida fetal (Braissant and Wahli, 1998).

II.1.2.4.2. MODELOS CELULARES DE ESTUDIO DEL ADIPOCITO MARRÓN .-Cultivos primarios de adipocitos marrones.-

Se han caracterizado diferentes protocolos de cultivos primarios de adipocitos marrones, a partir de precursores indiferenciados presentes en el tejido. Se han

Introducción

caracterizado modelos a partir de diferentes especies como el ratón (Rehmark et al., 1990; Houstek et al., 1990; Champigny et al., 1992), la rata (Champigny et al., 1992) y el hámster siberiano (Klaus et al., 1991). En estos sistemas, al igual que en el tejido, se consigue durante la diferenciación la expresión basal e inducida por la noradrenalina y otros factores hormonales, del gen UCP-1.

El sistema establecido por Rehmark y colaboradores se basa en aislar precursores presentes en el estroma vascular del tejido adiposo marrón de ratón y mantenerlos en unas determinadas condiciones hormonales que permiten la proliferación y posterior diferenciación a adipocito marrón. Las células son tratadas con suero fetal, insulina y T₃. Después de 3-4 días de proliferación, los preadipocitos llegan a confluencia y empiezan a diferenciarse, llegándose a ver las primeras inclusiones lipídicas. Entre los días 7-10 de cultivo, los preadipocitos ya están plenamente diferenciados tanto adipogénicamente como funcionalmente, con una gran capacidad respiratoria y con actividad termogénica, tal y como lo demuestra la expresión de la proteína UCP-1. En estos cultivos primarios, también se observa la inducción de la expresión de UCP-1 por la noradrenalina o agonistas β -adrenérgicos y T₃.

La diferenciación de adipocitos marrones en cultivo primario es un modelo celular que permite estudiar de manera bastante fidedigna el adipocito marrón, ya que los procesos de diferenciación y de respuesta a varios estímulos, se asemejan bastante a lo que está ocurriendo en el tejido *in vivo*. Este modelo ha permitido estudiar los perfiles de expresión a lo largo del cultivo (es decir, durante la diferenciación adipocitaria) de los genes característicos del adipocito marrón, como *ucp-1* (Rehmark et al., 1990; Álvarez et al., 2000). También ha sido útil para el estudio de la mitocondriogénesis, ya que se ha observado que durante el proceso de diferenciación del adipocito marrón en cultivo primario, se produce un incremento en la cantidad relativa de mtDNA y en la expresión del mtDNA, en coordinación con un incremento en la expresión de los componentes del sistema de la cadena respiratoria/ fosforilación oxidativa (OXPHOS) codificados por el genoma nuclear, como la COIV (subunidad IV de la citocromo oxidasa), así como factores de transcripción reguladores y coactivadores, como la subunidad α de NRF-2/GABP (*nuclear respiratory factor 2/GA binding protein*) o PGC-1 α (Villena et al., 2002).

Línea celular HIB-1B.-

La diferenciación del adipocito marrón y la regulación de *ucp-1* se pueden estudiar a partir de líneas celulares establecidas y mantenidas en cultivo en estado indiferenciado de preadipocito. Bajo unas determinadas condiciones de cultivo, se puede inducir el programa de diferenciación terminal de la célula, proceso que puede

ayudar a identificar factores de transcripción que inician y regulan la diferenciación adipocitaria.

La línea celular HIB-1B deriva de tumores de TAM de ratones transgénicos que expresan dirigidamente, bajo un promotor α P2/FABP, el antígeno T del virus SV40 en el tejido adiposo marrón. Mediante un medio diferenciador, los preadipocitos se diferencian a adipocitos adquiriendo el fenotipo y patrón de expresión de marcadores adipogénicos característicos (Ross et al., 1992). Una vez las células han llegado a confluencia, son tratadas con un medio inductor que incluye: insulina, hidrocortisona, isobutilmetilxantina (IBMX), T_3 y el fármaco antiinflamatorio no esterooidal indometacina.

El proceso de inmortalización, sin embargo, inhabilita la expresión basal de UCP-1 y sólo mediante el tratamiento con noradrenalina o agonistas de la vía del AMPc o ácido retinoico (Larose et al., 1996) se recupera su expresión en células diferenciadas (Klaus et al., 1994). Se ha descrito que agonistas PPAR γ también pueden inducir la diferenciación y estimular *ucp-1* en células HIB-1B (Tai et al., 1996). Sin embargo, el gen PPAR α no se expresa en esta línea celular y la activación de genes diana por activadores de receptores nucleares no se consigue sin la expresión ectópica de PPAR α (Valmaseda et al., 1999).

II. 1. 2. 5. UCP-1

II.1.2.5.1. LA PROTEÍNA DESACOPLADORA UCP-1 .-

Gran parte de la capacidad termogénica del TAM la determina la cantidad y actividad de la proteína UCP-1, localizada en la membrana mitocondrial interna (MMI). Es una proteína integrante del sistema OXPHOS y permeabiliza el paso de protones a través de la MMI, disminuyendo el gradiente electroquímico, desacoplándose el sistema de producción de ATP (Nicholls et al., 1978).

Es un polipéptido de 32kDa que dada su secuencia similar a la de otros transportadores mitocondriales (ATP/ADP, oxoglutarato/malato), se sugiere que su estructura también sería similar a la de estos transportadores. La proteína se presenta como un dímero con un lugar de unión a nucleótidos (Klingenberg, 1990). La unión de nucleótidos de purina a la proteína inhibe el paso de protones de ésta. UCP-1 también es capaz de transportar aniones cloruro, función también inhibible por nucleótidos. Se han observado efectos activadores del transporte de protones por ácidos grasos.

Ha sido siempre ampliamente reconocida la idea que UCP-1 actúa como un canal de protones, pero recientemente, Garlid *et al.* han propuesto un modelo alternativo donde el incremento de la conductancia de los protones debido a UCP-1 proviene del ciclo fútil producido por el paso de ácidos grasos a través de las membranas mitocondriales (Garlid *et al.*, 2001). De hecho, existen datos experimentales que indican que los ácidos grasos son esenciales para la función de UCP-1 (Jezek *et al.*, 1998), pero la cuestión de los mecanismos de regulación de la actividad de la proteína UCP-1 continúa siendo objeto de discusión (Rial and González-Barroso, 2001; Nedergaard *et al.*, 2001).

II.1.2.5.2. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE UCP-1.-

La regulación de la síntesis de la proteína UCP-1 se realiza principalmente a nivel de la regulación de la transcripción de *ucp-1* (Ricquier *et al.*, 1986). La expresión de UCP-1 en el TAM es paralela al proceso de diferenciación del adipocito marrón y se considera un marcador de la diferenciación terminal de este tipo celular.

Más allá de la diferenciación adipogénica, la transcripción de *ucp-1* se induce conjuntamente con las proteínas que permiten adquirir el fenotipo plenamente termogénico. En exposiciones crónicas a temperaturas bajas o dietas hipercalóricas, la proteína desacopladora aumenta su expresión en los adipocitos marrones maduros, pero también se induce la diferenciación de nuevos adipocitos marrones a partir de preadipocitos presentes en el TAM. El principal regulador de esta respuesta se ha considerado la noradrenalina, que incrementa la transcripción de *ucp-1*.

II.1.2.5.3. REGULACIÓN DEL PROMOTOR DE UCP-1.-

Los primeros estudios en la región 5' no codificante del gen de rata y ratón permitieron identificar el inicio de transcripción y la localización de la caja TATA y CCAAT, esenciales para la actividad basal del promotor (Bouillaud *et al.*, 1988a; Kozak *et al.*, 1988). Estos estudios muestran la presencia en esta región de zonas del DNA con hipersensibilidad a la DNAsa de tipo I (Bouillaud *et al.*, 1988a; Boyer and Kozak, 1991). El análisis de ratones transgénicos demuestra que los elementos responsables de la respuesta específica de tejido y de la estimulación β -adrenérgica del gen de rata se localizan en una región de 4.5 Kb de DNA a 5' del inicio de transcripción (Cassard-Doulcier *et al.*, 1993). Este mismo grupo identificó a través de transfecciones transitorias, dos regiones importantes en la regulación de *ucp-1*: una **región 5'**

proximal y un **elemento activador** de la transcripción (**enhancer**) de 211pb, localizado en una posición distal del promotor (**Figura 6**). Los estudios realizados con el promotor de *ucp-1* de ratón son comparables a los resultados obtenidos con el de rata (Boyer and Kozak, 1991; Kozak et al., 1994).

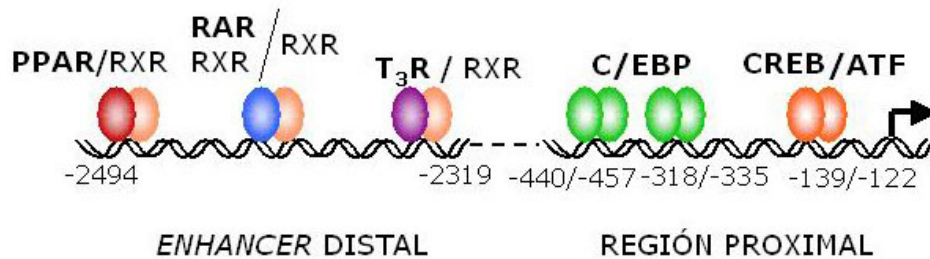


Figura 6. Representación esquemática de las principales regiones reguladoras del promotor de UCP-1. Destacan una región proximal, donde se unen los factores de transcripción de la familia C/EBP y CREB/ATF y un región *enhancer* distal con elementos de respuesta de receptores nucleares de hormonas.

Región 5' proximal.-

La región 5' proximal es la responsable de la actividad basal del promotor y contiene diferentes secuencias *cis*-reguladoras. Análisis por deleciones del promotor indican que la región mínima que mantiene la actividad del promotor está localizada entre -157 y -57 (Cassard-Doulcier et al., 1993).

El análisis mediante la técnica de *footprinting* de la región 5' proximal muestra la presencia de una secuencia *consensus* para un elemento **CRE**, entre -139 y -122 (Yubero et al., 1994b). Esta secuencia tiene capacidad para responder a la inducción por PKA, proteína cuya actividad está regulada por la noradrenalina vía los niveles de AMPc. La mutación de la caja CRE anula la expresión basal de la construcción y la inducción por PKA. Se conocen dos factores que se unen a la caja CRE y compiten por ella: el factor CREB (proteína de unión a CRE), que activado por la PKA induce la expresión de UCP-1 y el factor C-JUN, cuya expresión ectópica en adipocitos inhibe la expresión basal de UCP-1 dependiente de PKA. La expresión de C-JUN correlaciona inversamente con los niveles de UCP-1 y el proceso de diferenciación (Yubero et al., 1998). Dado que la respuesta a un estímulo termogénico por parte del adipocito es paralela al proceso de diferenciación y asociado a mayor presencia de receptor β_3 -adrenérgico, se ha propuesto un modelo de inhibición de UCP-1 por C-JUN durante la fase de preadipocito y un modelo de estimulación en el adipocito paralelo al proceso de

diferenciación y adquisición termogénica. Este modelo situaría la expresión de UCP-1 en fase terminal de diferenciación asegurando su baja expresión en preadipocitos cuando aún es necesario acumular lípidos para la adquirir el fenotipo adipocitario.

Dentro de la región 5' proximal, también se han identificado dos secuencias que presentan una alta homología con los elementos de respuesta a los factores de la familia **C/EBP**. La expresión de C/EBP α y C/EBP β en el TAM se encuentra asociada al desarrollo y actividad termogénica del tejido (Manchado et al., 1994). En estudios de cotransfección de adipocitos marrones en cultivo primario con vectores de expresión de estos dos factores se ha observado que se activa la transcripción a través de las secuencias presentes en el promotor de UCP-1, tanto en el promotor homólogo como en construcciones heterólogas (Yubero et al., 1994a). En estudios de interacción física con proteína purificada de los factores de transcripción C/EBP y extractos de TAM, se ha observado que estos factores presentan una gran afinidad por las secuencias de UCP-1 (Yubero et al., 1994a). Ratones con disrupción dirigida del gen C/EBP α muestran una expresión de *ucp-1* fuertemente disminuida (Carmona et al., 2002).

Región enhancer distal.-

Muchos de los estímulos hormonales, metabólicos y específicos de tejido que modulan la expresión de UCP-1, lo hacen mediante las secuencias que se encuentran en la región activadora, *enhancer*, del promotor. Estos elementos se sitúan entre -2494 y -2238 del promotor de rata y se han identificado, durante los últimos años, diferentes elementos de respuesta a receptores nucleares en esta zona. Este *enhancer* se ha visto que está presente en otras especies como el ratón o en humanos con mecanismos de regulación comunes (Kozak et al., 1994; Mar Gonzalez-Barroso et al., 2000a).

La regulación por **PPARs** se encuentra en la región -2485/-2458 del promotor de rata e incluye un elemento de respuesta a PPARs (PPRE) *consensus* formado por dos repeticiones directas separadas por un nucléotido (DR-1). Este elemento de respuesta tiene capacidad para unirse tanto a PPAR α como PPAR γ y está altamente conservado en el promotor de UCP-1 de humanos y ratones. El tratamiento con 15-deoxi-prostaglandina-J2, ligando de PPAR γ , transactiva el promotor de UCP-1 de ratón a través de la activación del heterodímero PPAR γ /RXR α (Sears et al., 1996). En células HIB-1B, la transactivación de una construcción que incluye el promotor de UCP-1 de rata está positivamente afectada por la cotransfección de PPAR α , por el tratamiento con ligandos específicos para el receptor nuclear y por la cotransfección con los coactivadores CBP (*CREB binding protein*) y PGC-1 α . La expresión de UCP-1, tanto a nivel de tejido como en adipocitos marrones en cultivo, también está regulada por activadores peroxisomales que ligan específicamente a PPAR α y esta regulación apunta

a una interacción vía promotor, dado que esta regulación es independiente de la síntesis proteica. La activación por PPAR α es dependiente de la disponibilidad de los ligandos endógenos para el receptor. Se ha postulado que el receptor PPAR α en el TAM estaría vehiculando tanto el estímulo termogénico, vía la activación de UCP-1, como el metabolismo lipídico (Barbera et al., 2001).

Los estudios de Álvarez *et al.*, fueron los primeros que demostraron la regulación de UCP-1 por el **ácido retinoico** y vieron que esta respuesta era debida a un elemento de respuesta en la zona *enhancer* del promotor (Alvarez et al., 1995). El 9-*cis* RA y el all-*trans* RA incrementan los niveles del mRNA de UCP-1 a través de la activación de ambos receptores RAR y RXR (Alvarez et al., 2000). El análisis de esta región mediante mutaciones puntuales y deleciones demuestra que la respuesta a RA se localiza dentro de una región de 90 pb situada en el extremo más a 5' del *enhancer* (Larose et al., 1996; Rabelo et al., 1996a). Dentro de esta región, se han descrito diversas secuencias responsables del mantenimiento de la respuesta a RA. Una de ellas es una secuencia con una estructura de repetición invertida espaciada por dos nucleótidos (IR2), que une *in vitro* a RAR y a RXR y que ha sido propuesta como un elemento de respuesta a RA, RARE, con una estructura no convencional. Otra de las secuencias descritas es un dominio AP-1 (proteína activadora 1) asociado a la secuencia RARE, la integridad del cual es necesaria para el mantenimiento de la respuesta de RA (Larose et al., 1996). El dominio AP-1 *consensus* reconoce el complejo AP-1. Los factores de transcripción de la familia jun/fos son integrantes del complejo AP-1 y por lo tanto su dominio puede vehicular estímulos derivados de señales de proliferación celular. La insulina puede activar también el complejo AP-1 (Kim and Kahn, 1994) y se ha sugerido una estimulación de UCP-1 a través de este complejo, mediante la activación de insulina/IGF-1 en adipocitos marrones fetales (Teruel et al., 1998). Dado que el derivado 9-*cis* RA es agonista RXR, éste tiene capacidad para transactivar genes diana de heterodímeros permisivos como PPAR/RXR (Keller et al., 1993).

Las **hormonas tiroideas** estimulan la expresión de UCP-1 a nivel transcripcional. Fuera de la región sensible a la respuesta vía RAR en dirección 3' se localizan dos elementos de respuesta a **T₃** (T₃RE): un elemento upT₃RE (*upstream* TRE) y otro situado más a 3' dnT₃RE (*downstream* TRE). Aunque reconocen la unión de RXR, el heterodímero T₃RE/RXR sólo es activado por la hormona T₃ y no por RA. La función de estos T₃REs fue confirmada por mutagénesis dirigida y transfección transitoria en células JEG-3 y en el sistema homólogo HIB-1B (Rabelo et al., 1995). La deleción o mutación puntual de una de las cajas produce una reducción sustancial de la respuesta al gen a T₃, lo que demuestra que las dos cajas son necesarias para la respuesta del promotor a la hormona. Las dos secuencias unen el receptor de hormonas tiroideas

(T₃R), pero con diferente grado de afinidad (Rabelo et al., 1996b): Los homodímeros formados por T₃R presentan más afinidad por la secuencia upT₃RE y se necesitan altas concentraciones de hormona para que el heterodímero T₃R/RXR se una a esta secuencia, en cambio dnT₃RE une preferencialmente los heterodímeros. En base a estos datos, se ha propuesto un mecanismo: En ausencia de T₃ *ucp-1* se encuentra silenciado debido al efecto represor producido por el homodímero T₃R/T₃R, unido principalmente a la caja upT₃RE. A medida que la concentración de T₃ va aumentando, se forman más heterodímeros que comienzan a ocupar la caja dnT₃RE y finalmente, a altas concentraciones de hormona, se produce un efecto sinérgico en la activación del gen gracias a que los receptores ocupan las dos cajas (revisión Silva and Rabelo, 1997).

II. 1. 2. 6. UCP-2 Y UCP-3

Recientemente han sido identificadas dos proteínas homólogas a UCP-1: la proteína **UCP-2** (Fleury et al., 1997) y la proteína **UCP-3** (Boss et al., 1997; Vidal-Puig et al., 1997), proteínas que tienen unos niveles de expresión altos en humanos adultos. Podrían actuar de manera similar a como lo hace UCP-1 y estar involucradas en el control del gasto energético en adultos. Sin embargo, estudios recientes indican que estas proteínas tienen distintas funciones fisiológicas. **UCP-2** se expresa abundantemente en macrófagos, en el timo y en los pulmones y parece estar involucrada en la regulación de las especies reactivas de oxígeno (ROS) producidas en la mitocondria (Negre-Salvayre et al., 1997; Arsenijevic et al., 2000). También se expresa en las células β-pancreáticas y en base a estudios de disrupción de *ucp-2* se ha postulado que UCP-2 actuaría como un regulador negativo de la secreción de insulina (Zhang et al., 2001). La regulación transcripcional de UCP-2 es débil y este gen parece estar regulado principalmente a nivel post-transcripcional (Pecqueur et al., 2001).

UCP-3 se expresa en el músculo esquelético y en el tejido adiposo marrón. La función de la proteína UCP-3 en el metabolismo no está clara y aún continua siendo objeto de debate, pero múltiples evidencias indican que podría estar implicada en la oxidación de ácidos grasos en el músculo esquelético (Bezair et al., 2001; García-Martínez et al., 2001). La expresión de *ucp-3* se induce por los propios ácidos grasos a través de receptores PPAR (Pedraza et al., 2000) y por lo tanto, activadores RXR pueden también promover la transcripción del gen. Hasta la fecha, el inductor más potente de *ucp-3* en células musculares en cultivo es el ácido retinoico (Solanes et al.,

2000), aunque el significado biológico de este efecto, como para UCP-1, está aún por determinar.

II. 1. 3. BIOGÉNESIS MITOCONDRIAL

II. 1. 3. 1. EL SISTEMA OXPHOS

En los mamíferos, el lugar principal de obtención de energía química en forma de ATP en condiciones anaeróbicas es la **mitocondria**. La presencia en estos orgánulos de un complejo sistema enzimático, la **cadena respiratoria**, permite la oxidación total de las moléculas orgánicas combustibles, y la energía que se libera es utilizada para la síntesis de ATP, en un proceso denominado **fosforilación oxidativa**. Las células modulan la actividad de estos complejos en función de sus requerimientos energéticos, a corto y a largo plazo (Enríquez et al., 1999b). Dada su unidad funcional, el conjunto de estos dos sistemas, conjuntamente con el transportador de P_i y la translocasa ATP/ADP, recibe el nombre de **sistema OXPHOS**.

II.1.3.1.1. COMPONENTES DEL SISTEMA OXPHOS.-

El sistema OXPHOS está formado por cinco grandes complejos proteicos, algunos de los cuales no han sido totalmente caracterizados debido a su gran complejidad estructural. Todos ellos, situados en la membrana mitocondrial interna (**Figura 7**), son los siguientes:

- ❖ Complejo I o NADH deshidrogenasa
- ❖ Complejo II o succinato deshidrogenasa
- ❖ Complejo III o citocromo reductasa
- ❖ Complejo IV o citocromo oxidasa
- ❖ Complejo V o F_0F_1 -ATP sintetasa (ATPasa)

El **complejo I** cataliza la transferencia de electrones desde el NADH, generado principalmente en la oxidación de glúcidos y lípidos, hacia el coenzima Q o **ubiquinona**. Este flujo de electrones provoca el bombeo de protones hacia el espacio intermembranal de la mitocondria. La ubiquinona es también el aceptor de los electrones que proceden de la oxidación del succinato en el ciclo de Krebs y que le son cedidos por el **complejo II**. Sin embargo, en este caso no se genera ningún flujo de protones como ocurría anteriormente (Poyton and McEwen, 1996). La ubiquinona reducida cede los electrones al **complejo III** que a su vez los transfiere al **citocromo c**, generándose de nuevo un flujo de protones hacia el espacio intermembranal. La tercera bomba de protones es el **complejo IV** que oxida al citocromo c y cede los

electrones al O_2 para formar H_2O (Poyton and McEwen, 1996). Los complejos del I al IV aprovechan la energía derivada del transporte de electrones desde el NADH y el $FADH_2$ hasta el O_2 para generar un gradiente de protones entre la matriz mitocondrial y el espacio intermembranal. La energía potencial acumulada en este gradiente es utilizada por el **complejo V** para sintetizar ATP a partir de ADP y P_i (Poyton and McEwen, 1996).

Para el correcto funcionamiento del sistema OXPHOS son esenciales además dos transportadores mitocondriales: el **transportador de P_i** y la **translocasa ATP/ADP** (transportador de nucleótidos de adenina o ANT), que de hecho son considerados parte del sistema. El primero de ellos actúa cotransportando fosfato y protones hacia la matriz mitocondrial, pero también puede actuar como un sistema antiporte de P_i y OH^- . El segundo actúa a modo de intercambiador de ADP citosólico por ATP sintetizado en la matriz mitocondrial, que es transportado al citosol.

De la misma manera, las **proteínas desacopladoras** o UCPs pueden ser consideradas también parte del sistema OXPHOS, al ser responsables del desacoplamiento de éste con el fin de generar calor frente a ciertas situaciones fisiológicas (ver apartado I.1.2.1) o bien con otras finalidades.

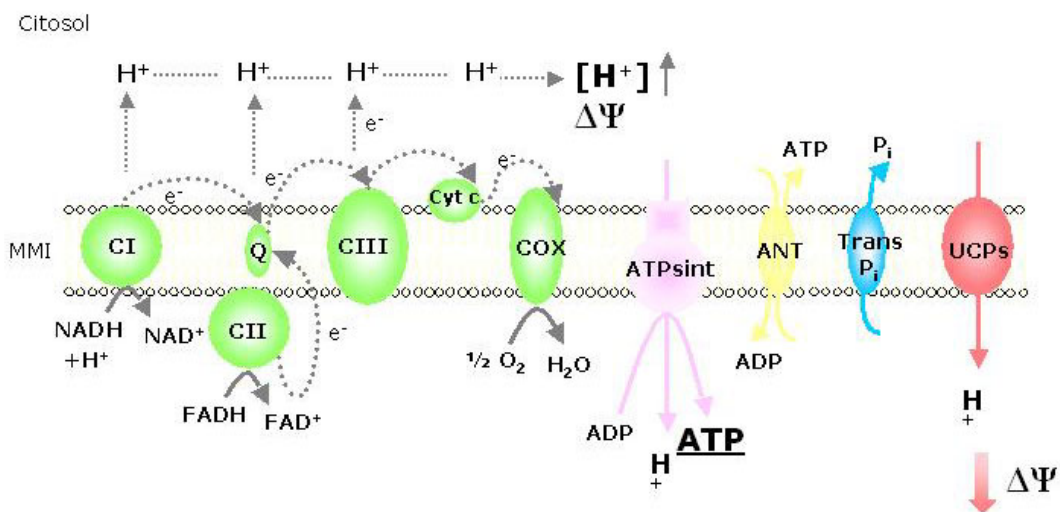


Figura 7. El sistema OXPHOS. Esquema representativo de los complejos proteicos que componen el sistema OXPHOS y de otras proteínas asociadas: complejos I al V (NADH deshidrogenasa, succinato deshidrogenasa, citocromo reductasa, citocromo oxidasa y ATPsintetasa), ADP/ATP *carrier* (translocasa de ADP/ATP), transportador de P_i y UCPs (proteínas desacopladoras).

II. 1. 3. 2. LOS GENES OXPHOS

La característica principal de los genes que codifican para las proteínas integrantes del sistema OXPHOS es que se hallan localizados en dos genomas diferentes. La gran mayoría de ellos corresponden a **genes nucleares** y únicamente trece de las proteínas del sistema están codificadas por el **genoma mitocondrial**. A parte de las implicaciones derivadas de la ubicación de ambos genomas en ubicaciones diferentes, cabe remarcar que se trata de dos sistemas genéticos muy diferentes, cada uno con una disposición particular de los genes y con la necesidad de sistemas de transcripción y traducción diferentes (Enríquez et al., 1999b).

Los **genes OXPHOS nucleares** presentan las características típicas de aquellos genes transcritos por la RNA polimerasa II, con intrones y exones en número y distribución particular para cada uno de ellos. Han sido clonados varios de ellos y caracterizados con detalle, incluyendo la región promotora, región que presenta también una gran variabilidad entre los diferentes genes, cosa que hace pensar en notables diferencias en su regulación. Es el caso de algunas subunidades de la citocromo oxidasa (IV, Vb y VIIc), el citocromo c del complejo III, las subunidades α , β y γ del complejo V, las tres isoformas de la translocasa ATP/ADP (ANT1, 2 y 3) o el gen UCP-1.

El **genoma mitocondrial** (mtDNA) es un sistema genético con características muy diferentes al nuclear (revisión Grossman, 1996 402 /id). Se trata de un número variable de moléculas de DNA circular, transmitidas de generación en generación, en mamíferos, mediante herencia materna. Su replicación es independiente de la del genoma nuclear, pero los componentes enzimáticos necesarios para que tenga lugar este proceso, así como los de transcripción y traducción de los genes que codifica, tienen un origen nuclear (Enriquez et al., 1999b; Taanman, 1999; Scarpulla, 1997).

En mamíferos es una doble cadena de DNA circular, de unas 16.6 Kb (**Figura 8**). Cada cadena se diferencia de la otra en función de su contenido en G+T, distinguiendo así la cadena pesada H (*heavy*) y la cadena ligera L (*light*). La mayoría de la información está codificada en la cadena pesada H (12 polipéptidos, 14 tRNAs y los dos rRNAs). La cadena ligera L codifica para 1 polipéptido y para 8 tRNAs. Los trece polipéptidos codificados por el mtDNA forman parte de los complejos proteicos del sistema OXPHOS (excepto del complejo II) (Poyton and McEwen, 1996; Taanman, 1999).

La organización genómica del mtDNA está altamente especializada en la economía del espacio. Los genes carecen de intrones y tanto los tRNAs como los rRNAs son inusualmente pequeños. Algunos de los genes se solapan y en ocasiones, no existen codones de terminación de la traducción, aunque se generan

postranscripcionalmente (Taanman, 1999). Existe una pequeña zona no codificante en el genoma mitocondrial, llamada **D-Loop** (*displacement loop*), con una estructura peculiar: consiste en una triple cadena, formada por las dos del mtDNA, más un pequeño *primer* de RNA, complementario a la cadena L y que desplaza la cadena H. Esta región contiene los **orígenes de transcripción** de ambas cadenas (HSP y LSP), así como el **origen de replicación** de la cadena pesada (O_H) y podría considerarse una región promotora de la transcripción, ya que se han identificado en ella secuencias que parecen estar involucradas en este proceso (Taanman, 1999).

La **cadena ligera** se transcribe como un sólo mRNA policistrónico, mientras que a partir de la **cadena pesada** se originan dos: uno de los transcritos corresponde al producto de la transcripción de toda la cadena, mientras que el otro policistrón incluye únicamente los genes codificados para dos tRNAs (fenilalanina y valina) y los rRNAs 12S y 16S. Esto explica que los rRNAs se encuentren en una proporción mayor que el resto de los transcritos. El mecanismo por el cual se originan los dos RNAs policistrónicos no está claro y se hipotetiza con la existencia de dos orígenes de transcripción de la cadena pesada, muy cercanos entre sí (Montoya et al., 1983; Micol et al., 1997) o bien, en la existencia de una señal específica de finalización de la transcripción al final del gen del rRNA 16S, en la que estaría implicado un factor de finalización de origen nuclear denominado mTERF o mTERM (Kruse et al., 1989; Hess et al., 1991). Los genes codificantes para los tRNAs se intercalan entre los genes que codifican para proteínas y rRNAs y actúan como señales de corte durante el procesamiento de los policistrones.

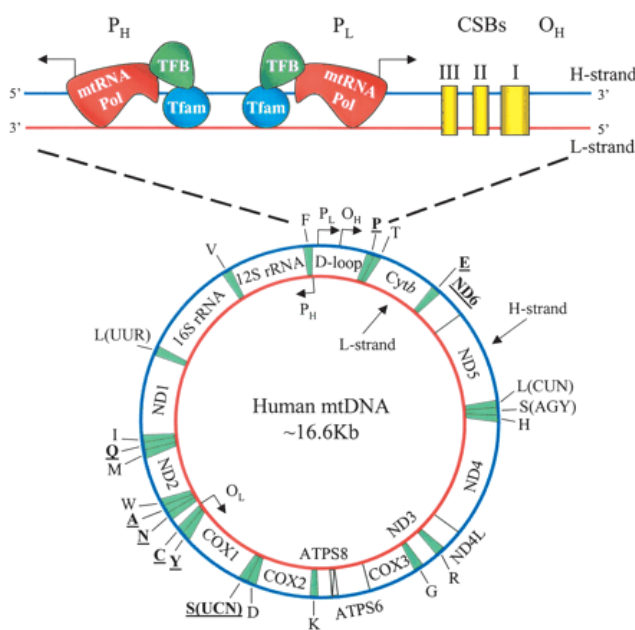


Figura 8. DNA mitocondrial (mtDNA) humano. Los genes que codifican para las proteínas y rRNAs se encuentran intercalados entre los genes de los 22 tRNAs. La región reguladora *D-loop* (ampliada en la parte superior) contiene los promotores de las cadenas L y H (P_L y P_{Hr} , respectivamente), juntamente con el origen de transcripción de la cadena H (O_H). Los complejos de transcripción del mtDNA incluyen la RNA polimerasa, TFAM (TFAM) y los TFBs. Los genes que codifican para proteínas incluyen las subunidades 1, 2 y 3 de la CO, las subunidades 1, 2, 3, 4, 4L, 5 y 6 de la NADH deshidrogenasa (ND), las subunidades 6 y 8 de la ATPsintetasa (Haraguchi et al., 1994) el citocromo b (Cytb).

II. 1. 3. 3. REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN DE LOS GENES OXPHOS

El ensamblaje y la funcionalidad de los componentes mitocondriales son el resultado, como ya se mencionó anteriormente, de la expresión de dos genomas claramente diferenciados: el mitocondrial y el nuclear. La capacidad codificante del mtDNA es muy limitada, de manera que la contribución nuclear a la biogénesis mitocondrial es esencial. De hecho, el 90% de la masa proteica de la mitocondria es de origen nuclear (Poyton and McEwen, 1996). Además de contribuir a la formación del sistema OXPHOS, el genoma nuclear aporta los enzimas responsables de generar los sustratos y cofactores necesarios para la función mitocondrial, así como las polimerasas y factores auxiliares requeridos para la transcripción y replicación del mtDNA y para el procesamiento y traducción del RNA.

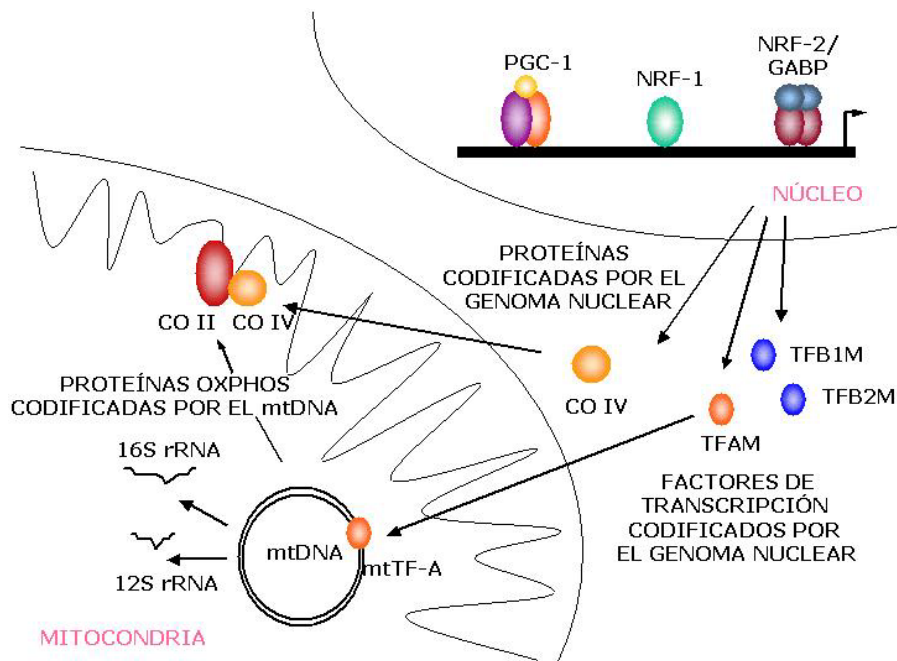


Figura 9. Regulación de los genes nucleares y mitocondriales del sistema OXPHOS. Se ha propuesto un modelo de regulación de la expresión génica del sistema OXPHOS que implica una coordinación entre el genoma nuclear y el mitocondrial.

La contribución de los dos genomas, el nuclear y el mitocondrial, en el proceso mitocondriogénico y más concretamente en la formación del sistema OXPHOS, pone de manifiesto la necesidad de uno o más mecanismos reguladores que permitan la

expresión coordinada de los genes involucrados y la síntesis en la estequiometría adecuada de las diversas subunidades de los complejos OXPHOS. Se ha propuesto un modelo en el que unos pocos factores de transcripción serían los responsables de la regulación de los genes implicados en la biogénesis mitocondrial, tanto de las subunidades nucleares de los diferentes complejos proteicos como de las proteínas reguladoras de la expresión del mtDNA (**Figura 9**). Parte de estos factores responderían a señales extracelulares coordinando la transcripción de los genes involucrados en la función oxidativa mitocondrial y otros factores responderían de la misma manera a las señales intracelulares indicadoras del estado energético de la célula. Los mecanismos responsables de esta regulación se conocen de forma minoritaria y aún no se ha planteado ninguna hipótesis satisfactoria que explique esta comunicación intergenómica.

A pesar de esto, sí que se han identificado varios factores de transcripción que regulan diversos genes clave relacionados, directa o indirectamente, con el metabolismo energético mitocondrial y más concretamente con el sistema OXPHOS.

Tabla 2

Tabla 2. Factores de transcripción y elementos implicados en la regulación transcripcional de los genes OXPHOS nucleares y mitocondriales	Referencias
NRF-1	Evans & Scarpulla, 1989; 1990
Citocromo c	Virbasius et al., 1993;
Citocromo oxidasa Vb	Bachman et al., 1996
	Seelan et al., 1992
Citocromo oxidasa VIIaL	Chau et al., 1992
ATP sintetasa γ	Evans & Scarpulla, 1990
MRP RNA	Virbasius & Scarpulla, 1994
TFAM	
NRF-2	
Citocromo oxidasa IV	Virbasius & Scarpulla, 1991;
	Carter et al., 1992
Citocromo oxidasa Vb	Virbasius JV et al., 1993;
	Bachman et al., 1996

NRF-2

Citocromo oxidasa VIIaL
ATP sintetasa β

Seelan et al., 1996
Virbasius JV et al., 1993;
Villena et al., 1994; 1998
Virbasius & Scarpulla, 1994
Rantanen, A et al., 2002

TFAM

Promotores de las cadenas pesada y ligera
mitocondriales

Fisher et al., 1987; 1989

TFBMs

Promotores de las cadenas pesada y ligera
mitocondriales

Rantanen, A et al., 2002,
Falkenberg et al., 2002

mTERF

Región de terminación de la transcripción

Cooper et al., 1993

OXBOX/REBOX

Translocasa ATP/ADP, isoforma de músculo

ATP sintetasa β

Haraguchi et al., 1994;
Chung et al., 1992
Haraguchi et al., 1994;
Chung et al., 1992

MtEBPs

Proteína de unión a ubiquinona
Citocromo c_1
ATP sintetasa β
Citocromo c
D-loop mitocondrial

Suzuki et al., 1990
Suzuki et al., 1990
Suzuki et al., 1990
Suzuki et al., 1990
Suzuki et al., 1995

II.1.3.3.1. FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN NUCLEARES .-**NRF-1 (nuclear respiratory factor 1).-**

NRF-1 es un factor de transcripción al que se le ha asignado un importante papel como integrador del control de la expresión de genes oxphos. Se ha descrito la existencia de sitios de unión funcionales para NRF-1 en los genes del citocromo c (Evans and Scarpulla, 1989; Evans and Scarpulla, 1990) y en los de varias de las subunidades de cada uno de los complejos III, IV y V del sistema OXPHOS, como los genes codificados para la Q-BP (*ubiquinone binding protein*) (Evans and Scarpulla, 1990), CO Vb (Virbasius et al., 1993a), CO VIc (Suske et al., 1988), CO VIIaL (Seelan et al., 1996) y γ -F_i-ATP sintetasa (Chau et al., 1992). A estos genes hay que añadir los genes del MRP-RNA (*mitochondrial RNA processing RNA*) y el TFAM (*mitochondrial transcription factor A*) que también están regulados por NRF-1 (Evans and Scarpulla, 1990; Virbasius et al., 1993a; Virbasius and Scarpulla, 1994). El gen MRP-RNA codifica para un RNA que forma parte de una ribonucleasa mitocondrial esencial en el procesamiento de los transcritos originados a partir del mtDNA y en la replicación de éste. Por su parte, TFAM activa de manera muy importante la transcripción de los genes mitocondriales al unirse a las regiones promotoras de las cadenas pesada y ligera del mtDNA (Fisher et al., 1987; Fisher et al., 1989).

NRF-2 (nuclear respiratory factor 2).-

Los estudios realizados por Virbasius y Scarpulla sobre el promotor del gen de la CO IV de rata (Virbasius and Scarpulla, 1990) revelaron la existencia de elementos en *cis* capaces de unir un nuevo tipo de factor de transcripción que se denominó NRF-2, cuyo homólogo murino recibe el nombre de GABP (*GA binding protein*) y que es el responsable de la actividad basal de dicho gen (Virbasius and Scarpulla, 1991; Carter et al., 1992). El papel como activador transcripcional de NRF-2 o de sus homólogos en ratón (Virbasius et al., 1993b) y humanos (Watanabe et al., 1988) se ha extendido a otros genes oxphos como *co Vb* (Carter et al., 1992), *co VIIc* (Seelan and Grossman, 1997) y *co VIIaL* (Seelan et al., 1996), así como el gen que codifica para TFAM (Virbasius and Scarpulla, 1994).

Aunque NRF-1 y NRF-2 tienen una nomenclatura parecida debido a su implicación en la regulación de proteínas relacionadas con la fosforilación oxidativa, NRF-1 se une al DNA en forma de homodímero y presenta una estructura modular característica de muchos factores de transcripción (Virbasius et al., 1993a), mientras que NRF-2 pertenece a una familia más amplia definida por la presencia de un nuevo tipo de dominio de unión al DNA, denominado ETS (Wasylyk et al., 1993).

Introducción

NRF-2/GABP es una proteína oligomérica formada por dos tipos de subunidades: GABP α que contiene el dominio ETS de unión al DNA y la subunidad GABP β que es imprescindible para que la subunidad GABP α y la GABP β formen un complejo estable y funcional (LaMarco et al., 1991; Thompson et al., 1991).

PGC-1 α (coactivador del receptor activado por proliferadores peroxisomales γ -1 α).-

PGC-1 α es una proteína que se ha visto implicada en el proceso de biogénesis mitocondrial. Actúa como coactivador de varios factores de transcripción (ver apartado II.1.2.2.1), entre ellos NRF-1 (Puigserver et al., 1998; Wu et al., 1999a). Estudios *in vitro* con la línea celular miogénica C2C12 demuestran que este coactivador promueve la biogénesis mitocondrial aumentando por un lado la expresión de NRF-1 y la subunidad α de NRF-2 y por otro interactuando con NRF-1 incrementando así la actividad de este factor de transcripción sobre el promotor de TFAM y probablemente sobre otros promotores de genes del sistema OXPHOS. La consecuencia final es un aumento de la expresión de TFAM y una importante proliferación de las mitocondrias (Wu et al., 1999a). Durante el desarrollo del tejido adiposo marrón, tejido con una gran capacidad termogénica gracias al alto contenido en mitocondrias que posee, PGC-1 α incrementa su expresión juntamente con el incremento en la cantidad de mtDNA y de la expresión de genes del sistema OXPHOS, implicando a este coactivador en la regulación de biogénesis mitocondrial en el TAM (Villena et al., 2002).

Otros factores de transcripción.-

A parte de la regulación transcripcional de los genes implicados en la biogénesis mitocondrial mediante factores de transcripción, se ha propuesto una regulación coordinada de la transcripción nuclear y mitocondrial mediada por elementos *cis* comunes a ambos genomas, a los cuales se unirían factores de transcripción similares. En este sentido, se han estudiado conjuntamente los promotores de varios genes oxphos, así como el mtDNA, especialmente a nivel del *D-loop*, y se ha llegado, en algunas ocasiones, a la identificación de estos posibles elementos. Los más destacados son las **secuencias OXBOX/REBOX** y los **elementos Mt**, aunque todavía no ha sido posible la caracterización de las proteínas que se unen a ellos (Li et al., 1990; Haraguchi et al., 1994; Chung et al., 1992; Suzuki et al., 1991; Suzuki et al., 1995).

Los factores de transcripción descritos anteriormente son básicamente elementos reguladores de genes OXPHOS. Sin embargo, existen otras proteínas con un papel importante en la regulación de estos genes, pero que extienden su acción a muchos otros, no necesariamente ligados al metabolismo energético. Es el caso del factor de transcripción **Sp1**, que controla la expresión de genes como la subunidad IV y V de la citocromo oxidasa (Carter et al., 1992), el citocromo c_1 (Li et al., 1996b), el gen de la

translocasa ANT2 (Li et al., 1996a) y el de la subunidad β de la ATPasa (Villena et al., 1998), si bien regula de manera importante otros muchos promotores.

Algo similar ocurre con el factor de transcripción **CREB**, que se une a lugares específicos en el promotor del citocromo c y activa su transcripción como consecuencia de un aumento de los niveles de AMPc intracelulares (Evans and Scarpulla, 1989).

II.1.3.3.2. FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN NUCLEARES REGULADORES DEL mtDNA.-

TFAM (mitochondrial transcription factor A).-

La transcripción y replicación del mtDNA dependen de factores codificados por el núcleo. Uno de los mejores caracterizados es el TFAM. Esta proteína de 25kDa, estimula la transcripción, mediada por la RNA polimerasa, a partir de los promotores de la cadena pesada y ligera del mtDNA, a nivel del D-loop (Clayton, 1991). Además, TFAM está involucrada en procesos de empaquetamiento del mtDNA (Alam et al., 2003) y se ha sugerido que también participaría en la replicación del genoma mitocondrial (Gensler et al., 2001).

La sobreexpresión de TFAM *in vitro* provoca un aumento de transcritos mitocondriales (Montoya et al., 1997); sin embargo, estudios en ratones *knockout* para este factor de transcripción revelan una disminución del contenido de mtDNA, sin cambios en los niveles de mRNAs, en los animales que presentan una reducción del 50% del TFAM (Larsson et al., 1998). Estos datos demuestran que TFAM es esencial para el mantenimiento del mtDNA durante el desarrollo (Larsson et al., 1998) y que además está involucrado en el control del número de copias de mtDNA (Ekstrand et al., 2004).

La regulación transcripcional de TFAM depende de los factores de transcripción NRF-1 y NRF-2, además de presentar secuencias de unión para Sp-1, si bien parece que NRF-1 es el factor imprescindible para que este gen se exprese (Virbasius and Scarpulla, 1994)

A parte de su función en la transcripción mitocondrial, TFAM parece jugar un papel en el mantenimiento del mtDNA. Su unión no se restringe a la región D-loop, sino que también lo hace a secuencias adyacentes (Fisher et al., 1992; Ghivizzani et al., 1994).

mTERF (mitochondrial transcription termination factor).-

mTERF es otra proteína codificada por el genoma nuclear y que ejerce su función en la mitocondria. Se haya involucrada en la finalización de la transcripción a nivel del

Introducción

rRNA 16S, entre éste y el tRNA de leucina. Fue identificado como una actividad que se unía a dicho lugar promoviendo la terminación *in vitro* (Kruse et al., 1989).

Es una proteína de 34 kDa que muestra una secuencia de localización mitocondrial que se pierde en la proteína madura. Presenta tres cremalleras de leucina (*leucine zippers*) y dos dominios básicos ampliamente separados, ambos elementos necesarios para que la proteína se una al mtDNA (Fernandez-Silva et al., 1997). La finalización de la transcripción probablemente ocurre por el impedimento físico que representa la presencia de mTERF, más que por una interacción específica de este factor con la RNA polimerasa (Shang and Clayton, 1994).

TFB1M y TFB2M (mitochondrial transcription factor B1 y B2).

Recientemente, se han caracterizado dos nuevos factores de transcripción mitocondriales humanos, TFB1M y TFB2M y se ha observado que su expresión es mayor en tejidos con una alta actividad oxidativa, como el corazón, el hígado o el músculo esquelético y que interactúan directamente con la RNA polimerasa y activan la transcripción mitocondrial *in vitro* (Falkenberg et al., 2002). Más tarde, el mismo grupo identificó los genes de ratón ortólogos a TFB1M y TFB2M humanos y se observó que éstos tenían unos patrones de expresión similares a los TFBMs humanos y que presentaban en sus regiones promotoras potenciales secuencias de unión a los factores de transcripción Sp1 y NRF-2 (Rantanen et al., 2003). Se ha propuesto que TFB1M y TFB2M constituirían otro nivel de regulación de la expresión del mtDNA en células de mamífero y, aunque TFB2M muestra una actividad diez veces mayor que TFB1M *in vitro*, el papel específico de estos factores de transcripción en la regulación de la expresión del mtDNA y cómo se regulan éstos según las necesidades energéticas del organismo es aún desconocido.

II.1.3.3.3. REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN MITOCONDRIAL POR GLUCOCORTICOIDES Y HORMONAS TIROIDEAS.

El receptor de glucocorticoides.

Se han hallado seis elementos de respuesta a glucocorticoides (**GREs**) en el mtDNA y se ha comprobado *in vitro* que el receptor de glucocorticoides (**GR**) es capaz de unirse a ellas. Dos de estos elementos están localizados en el *D-loop*, mientras que los otros cuatro se hallan dentro de los genes de las subunidades I y III de la citocromo oxidasa (Demonacos et al., 1995). Se ha observado que, después de tratar a ratas con dexametasona, el GR es translocado a la mitocondria (Demonacos et al., 1996) y recientemente, se ha demostrado que estos receptores son funcionales

(Tsiriyotis et al., 1997), por lo que se ha propuesto un posible papel de estas hormonas en la regulación de la transcripción mitocondrial (Demonacos et al., 1995), aunque su importancia fisiológica aún se desconoce (Enriquez et al., 1999b).

Las hormonas tiroideas.-

Las hormonas tiroideas juegan un papel muy importante en la regulación de la biogénesis mitocondrial y consecuentemente, de la actividad de la mitocondria (Mutvei et al., 1989). Esta regulación la llevan a cabo a través de diferentes mecanismos, según se trate de genes oxphos mitocondriales o nucleares (Wiesner et al., 1992).

El efecto de la T_3 sobre la regulación transcripcional de **genes nucleares** se lleva a cabo a través de los receptores de hormonas tiroideas (TRs), que pertenecen a la familia de receptores nucleares dependientes de ligando. La T_3 se une a su receptor TR que, a través de los elementos de respuesta a T_3 (TRE) presentes en genes nucleares que codifican para proteínas mitocondriales, activan la transcripción. Sólo una pequeña parte de los genes nucleares involucrados en la biogénesis del sistema OXPHOS responde e las hormonas tiroideas (Pillar and Seitz, 1997). De entre ellos, únicamente el promotor del gen del citocromo c_1 responde a la inducción directa de las hormonas tiroideas mediada por sus receptores nucleares (Nelson et al., 1995). Para el resto de los genes que se ven regulados por las hormonas tiroideas y que no presentan secuencias TRE, se ha propuesto un mecanismo indirecto de estas hormonas sobre la expresión de dichos genes. NRF-1 y PGC-1 α se han propuesto como buenos candidatos a mediar este efecto indirecto ya que se ha observado que ambos genes están regulados por hormonas tiroideas (Pillar and Seitz, 1997; Weitzel et al., 2001).

Con respecto al **mtDNA**, se ha observado que el tratamiento con T_3 de mitocondrias aisladas de hígado de rata estimula la RNA polimerasa mitocondrial, en ausencia de la influencia del núcleo (Martino et al., 1986). Además, Enriquez *et al.* han demostrado que el tratamiento a corto plazo de mitocondrias aisladas modula los niveles de mtRNA y la relación mRNA/rRNA, a través de la regulación de la tasa de transcripción (Enriquez et al., 1999a). Todos estos resultados indican que el efecto de las hormonas tiroideas sobre la transcripción mitocondrial implica una acción directa de estas hormonas sobre la maquinaria de transcripción de la mitocondria. En concordancia con estos resultados, se ha purificado una proteína de 43 Kda (p43) relacionada con c-erb A α_1 (Forman et al., 1995), localizada en la matriz mitocondrial. Se ha visto que es capaz de unirse a TREs situados en el mtDNA y presenta una alta afinidad por la hormona T_3 del mismo orden de magnitud que el receptor nuclear de esta hormona (Wrutniak et al., 1995; Casas et al., 1999). También se ha observado que p43 incrementa la transcripción del mtDNA y la relación mRNA/rRNA mediante una

mecanismo dependiente de T_3 , con el consiguiente aumento en la síntesis de proteínas mitocondriales (Casas et al., 1999).

II. 1. 3. 4. REGULACIÓN DE LA BIOGÉNESIS MITOCONDRIAL EN EL TEJIDO ADIPOSO MARRÓN

El tejido adiposo marrón se caracteriza por presentar una elevada capacidad oxidativa y esto es gracias a la cantidad de mitocondrias que contiene. Dicha capacidad oxidativa está finamente regulada según las condiciones fisiológicas del organismo, por lo que el TAM es capaz de regular el proceso de biogénesis mitocondrial de manera muy controlada. Así, gracias a su gran plasticidad, el TAM representa un buen modelo de estudio de los cambios en la biogénesis mitocondrial y en la capacidad oxidativa del tejido dependiendo de los estímulos externos.

A nivel bioquímico, la elevada capacidad oxidativa del TAM se traduce por una elevada actividad citocromo oxidasa, muy superior a la de otros tejidos como el corazón, músculo esquelético, cerebro o hígado (Houstek et al., 1991). La actividad de la citocromo oxidasa en el TAM se correlaciona claramente con el contenido de este complejo en este tejido, aunque el mRNA de varias de las subunidades del complejo V es muy elevado en adipocitos marrones (Houstek et al., 1991). Además, de acuerdo con la función del tejido, los niveles proteicos de F_0F_1 -ATP sintetasa son bajos en relación con el resto de componentes oxphos. Parece ser que la baja expresión de la subunidad c de la ATPasa, sería el factor limitante que determinaría la poca actividad de este complejo en el TAM (Houstek et al., 1995).

Mitocondriogénesis durante el desarrollo del TAM.-

En ratón y rata, el TAM se desarrolla en la última semana de vida prenatal y el proceso de mitocondriogénesis se inicia también durante este período. Entre los días 15 y 16 de vida intrauterina en ratón, y 16 y 17 en rata, se detectan niveles considerables de las proteínas oxphos CO II, CO IV y CO V y de sus mRNAs, que aumentan de forma espectacular y presentan máxima expresión en el momento del nacimiento (Houstek et al., 1988; Villena et al., 1998). La cantidad del complejo F_0F_1 -ATP sintetasa se incrementa sólo ligeramente en este período (Villena et al., 1998). A partir de este momento, y hasta poco después del nacimiento, los niveles de las proteínas oxphos citadas aumentan paulatinamente, para después decaer de manera lenta y gradual durante el resto de vida del organismo.

Todos estos cambios en el contenido proteico del tejido van acompañados de modificaciones morfológicas de las mitocondrias (ver apartado I.1.2.4.1), necesarias para la localización de las proteínas del sistema OXPHOS.

Cambios relacionados con la temperatura ambiental.-

Como ya se comentó anteriormente, el tejido adiposo marrón incrementa su capacidad termogénica como respuesta a la **exposición al frío** (ver apartado I.1.2.2). En exposiciones agudas, el aumento en la producción de calor se consigue por un incremento en la utilización de sustratos oxidables y en la actividad de la proteína UCP-1. En exposiciones crónicas, la respuesta del TAM se produce a tres niveles: a) se incrementa el contenido de UCP-1 en las mitocondrias, b) aumenta el número de mitocondrias en los adipocitos marrones maduros y c) se generan nuevos adipocitos a partir de células precursoras (Nedergaard et al., 1995; Ross et al., 1992). Cuando se analiza el efecto de la exposición al frío o de un estímulo adrenérgico sobre la cantidad y composición del TAM, se observa un aumento importante en el contenido total de mitocondrias, aunque debido a que el tejido sufre procesos de hipertrofia, el porcentaje de proteína mitocondrial respecto a proteína total no varía en exceso (Mory et al., 1984).

Una situación distinta es la que se observa en animales **readaptados a altas temperaturas** tras la exposición al frío. En estos animales se observa una reducción rápida en la cantidad de proteína mitocondrial, consecuencia de la disminución de la termogénesis adaptativa que ha de sufrir el tejido (Desautels and Himms-Hagen, 1980). Parece ser que el contenido mitocondrial del TAM es muy sensible a estímulos termogénicos negativos, al igual que en situaciones de lactancia y otros tipos de dietas.

Los estudios realizados a nivel de expresión génica del sistema OXPHOS, en situaciones de estimulación adrenérgica del TAM, son escasos. Se ha descrito que en hámsters, los niveles de la citocromo oxidasa aumentan hasta 2.5 veces en animales expuestos al frío de forma crónica, aumento que se correlaciona con un incremento en la expresión de varias de las subunidades de este complejo (Klingenspor et al., 1996). También en rata se ha descrito un comportamiento similar para el gen de la subunidad II de la citocromo oxidasa (Martin et al., 1993).

Cambios en respuesta a la dieta.-

A parte del mantenimiento de la eutermia, el tejido adiposo marrón juega un papel importante en el control del peso corporal mediante la disipación en forma de calor de parte de la energía aportada por la dieta (**termogénesis inducida por la dieta**) (ver apartado I.1.2.2). El efecto mitocondriogénico es similar al descrito en el

caso del frío: las **dietas hipercalóricas** provocan un aumento del mRNA y la proteína UCP-1 (Rothwell and Stock, 1986), mientras que en situación de **ayuno** se produce una disminución en la expresión de *ucp-1* y en el contenido mitocondrial del TAM (Champigny and Ricquier, 1990; Desautels, 1985). En el caso de dietas hipocalóricas persistentes, la disminución en la termogénesis se consigue principalmente por una reducción en los niveles de UCP-1 y especialmente en la actividad mitocondrial del tejido adiposo marrón (Villarroya et al., 1986a).

Cambios durante la gestación y la lactancia.-

Los requerimientos energéticos del embarazo y la lactancia son modulados por la madre incrementando la ingesta y reduciendo el gasto energético. En roedores y principalmente durante la lactancia, se ha observado una **disminución de la capacidad termogénica** del TAM (Trayhurn et al., 1982), debida principalmente a una reducción en el contenido mitocondrial (Villarroya et al., 1986a; Villarroya et al., 1986b). Estos cambios se correlacionan a nivel molecular con una disminución en la expresión de genes nucleares oxphos, como CO II, CO IV, ND 1, ANT1, ANT2 y de manera muy considerable, UCP-1 y no se detectan cambios en los niveles de los mensajeros de la β -F1-ATP sintetasa u otros genes no relacionados con el sistema OXPHOS como la LPL (Martín et al., 1995).

Si coinciden una dieta hipocalórica con el período de lactancia, entonces se puede llegar a niveles mínimos del contenido mitocondrial del tejido adiposo marrón (Villarroya et al., 1986a).

II. 2. EL VIH Y SU TRATAMIENTO

II. 2. 1. GENERALIDADES

La infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) se caracteriza por un periodo asintomático prolongado que concluye con la enfermedad del síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (Richman, 2001). El VIH infecta, principalmente, a linfocitos T CD4, específicamente cuando estos se encuentran en estado activado (Haase, 1999), es decir, cuando han estado en contacto con un determinado antígeno, han proliferado y han desarrollado sus funciones de defensa. El VIH no se replica en estas células, pero puede establecer en ellas un estado de infección latente (Chun et al., 1995), que es "invisible" al sistema inmunitario y que hace que, por el momento, cualquier terapia quimioterapéutica sea inefectiva para su total erradicación.

Esta infección selectiva del VIH sobre linfocitos CD4 da lugar a una inmunosupresión generalizada, que desemboca en varias complicaciones que caracterizan el SIDA, como son debilidad, alteraciones neurológicas y infecciones oportunistas.

Aproximadamente entre 10^7 - 10^8 linfocitos CD4 son infectados por el VIH. La tasa de producción de virus es una función del número de linfocitos infectados en el tejido linfático, por lo que los niveles de RNA del virus son directamente proporcionales al grado de decaimiento de los linfocitos CD4. Como el recuento de linfocitos CD4 determina el riesgo de enfermedad y muerte, y los niveles de RNA viral determinan la tasa de afectación de las células CD4, estos valores son utilizados rutinariamente para el análisis del estado clínico del paciente y para determinar el momento de iniciación del tratamiento quimioterapéutico.

II.2.1.1. Terapia antiretroviral.-

La administración de una potente combinación de fármacos consigue una rápida reducción de los niveles de RNA virales en plasma y de células infectadas en el tejido linfático. Esta rápida reducción se atribuye a la muerte de células CD4 infectadas y a la prevención de nuevas infecciones (Perelson et al., 1996). Unos niveles de RNA viral que excedan las 50 copias por mililitro de plasma (límite de detección de los actuales ensayos de detección), indicarían una supresión inadecuada y un riesgo de infección por parte de virus resistentes (Carpenter et al., 2000).

Las consecuencias inmunológicas de la supresión de la replicación del virus son muy importantes, dando lugar a un incremento en el número de linfocitos CD4. Pero la regeneración del número de células no es suficiente. Ha sido la restauración de la

función inmune lo que ha transformado la historia natural del SIDA. Ambas respuestas de células CD4 y CD8 para responder a antígenos son regeneradas y, consecuentemente, las infecciones oportunistas persistentes, en la mayoría de los casos, son resueltas (Li et al., 1998), (Komanduri et al., 1998). Además, los costes sanitarios han disminuido y muchos pacientes enfermos han podido volver a su vida normal.

Pero este dramático impacto de la terapia contra el VIH sobre la restauración del sistema inmune también tiene un coste: el precio, la inconveniencia y la toxicidad de la terapia antiretroviral.

II.2.1.2. Fármacos antiretrovirales.-

Los fármacos antiretrovirales utilizados actualmente para el tratamiento de la infección por el VIH se agrupan en tres grupos principales: Los **inhibidores de la transcriptasa reversa análogos de nucleósidos (NRTIs)**, los **inhibidores de la transcriptasa reversa no-análogos de nucleósidos (NNRTIs)** y los **inhibidores de la proteasa (PIs)** (Richman, 2001). **Tabla 3**

Tabla 3. Fármacos antiretrovirales de uso estándar

Inhibidores de la transcriptasa reversa, análogos de nucleósidos (NRTIs)	
Abacavir (ABC)	Lamivudina (3TC)
Estavudina (d4T)	Zalcitabina (ddC)
Didanosina (ddI)	Zidovudina (AZT)
Inhibidores de la transcriptasa reversa, no-análogos de nucleósidos (NNRTIs)	
Efavirenz	Delavirdina
Nevirapina	
Inhibidores de la proteasa (PIs)	
Amprenavir	Lopinavir
Nelfinavir	Ritonavir
Indinavir	Saquinavir

El VIH necesita convertir su RNA de cadena simple a DNA de cadena doble para poder así integrar su material genético en el DNA de la célula huésped y utilizar la maquinaria genética del huésped para la producción de nuevas partículas infecciosas. Cada tipo de fármaco interviene de manera distinta y coordinada en el bloqueo de

tanto la replicación como la maduración del virus, consiguiendo así un mejor control de la carga viral y consecuentemente, un mejor control del desarrollo del SIDA.

Inhibidores de la transcriptasa reversa, análogos de nucleósidos (NRTIs)

Los NRTIs son compuestos derivados de adenosina, citosina, guanosina y timina. Como tales, actúan como sustrato alternativo para el proceso de polimerización del DNA. Una vez dentro de la célula, estos compuestos son fosforilados para generar la forma 5'-trifosfato. La modificación química más importante de estos compuestos es que carecen del extremo 3'OH, o en el caso de la zidovudina este extremo está modificado hacia un grupo azido (N_3). Esta modificación evita la formación del enlace 3'-5' fosfodiéster entre la cadena de DNA en elongación y el nucleósido 5' trifosfato entrante. De esta manera, los NRTIs actúan como terminadores de la función de la transcriptasa reversa del virus.

Los NRTIs de uso estándar que se utilizan actualmente son: estavudina (d4T), didanosina (ddI), lamivudina (3TC), zidovudina (AZT), zalcitabina (ddC) y abacavir (ABC). (**Figura 10**)

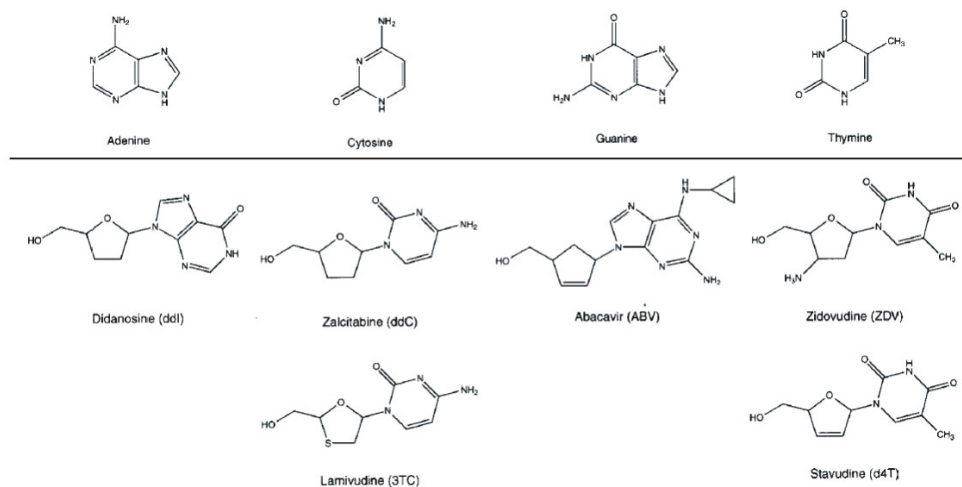


Figura 10. Estructura química de las bases nitrogenadas naturales que componen la cadena de DNA y de los inhibidores de la transcriptasa reversa análogos de nucleósidos.

Inhibidores de la transcriptasa reversa, no-análogos de nucleósidos (NNRTIs)

Los NNRTIs incluyen un grupo de compuestos policíclicos de naturaleza química divergente que actúan uniéndose al dominio catalítico de la transcriptasa reversa, afectando su movilidad y evitando su funcionamiento normal. Este grupo de fármacos incluyen: efavirenz, delavirdina y nevirapina.

Inhibidores de la proteasa (PIs)

Los PIs fueron diseñados como compuestos que se unen al lugar donde la proteasa del VIH corta a los polipéptidos que darán lugar a las proteínas víricas maduras y funcionales. De esta manera, las nuevas partículas víricas son incapaces de madurar o resultar infecciosas.

Los PIs que se utilizan en la terapia antiretroviral son: amprenavir, indinavir, lopinavir, nelfinavir, ritonavir y saquinavir.

La combinación de estos tres tipos de fármacos, típicamente dos inhibidores de transcriptasa reversa análogos de nucleósidos más un inhibidor de proteasa o un no-análogo de nucleósidos, constituye lo que se denomina **terapia antiretroviral de elevada actividad (HAART o highly active antiretroviral therapy)**. La terapia HAART ha permitido reducir muy considerablemente la morbilidad y la mortalidad relacionada con el virus HIV y muchos de los tratamientos HAART consiguen una reducción casi completa de la replicación del VIH. HAART es actualmente la terapia estándar de uso clínico.

II.2.1.3. Retos para una terapia exitosa.-

La instauración de la terapia HAART ha resultado ser muy efectiva en el control de la enfermedad del SIDA, pero también presenta una serie de retos que hay que superar para el éxito completo de la terapia.

Cada uno de los fármacos antiretrovirales aprobados es capaz de reducir los valores de RNA viral en plasma y de recuperar el número de células CD4, pero sólo mediante la combinación de tres o más fármacos antiretrovirales y durante un largo período de tiempo, se consigue la supresión sostenida de la carga viral. Esto implica la necesidad de controlar la **adherencia** al tratamiento, factor clave en el éxito de la terapia.

Otro factor cada vez más importante a tener en cuenta en el tratamiento antiretroviral es la **variabilidad interindividual** de los valores de fármaco en plasma, que hacen que para una misma dosis, haya pacientes que no respondan al tratamiento

y otros que sufran problemas de toxicidad. Hay cada vez más evidencias que sugieren que determinados polimorfismos genéticos serían los responsables en gran parte de esta variabilidad. Además, la interacción con otros fármacos y la dieta añadirían variabilidad a este factor.

La **distribución tisular diferencial** de los fármacos antiretrovirales también representa un problema a afrontar, ya que dichos reservorios pueden dar lugar a replicaciones locales del virus.

Y por último, **no hay fármaco sin toxicidad**. Cuando los fármacos antiretrovirales se introdujeron por primera vez, los riesgos y la toxicidad asociados fueron tolerados frente a la amenaza inminente de la enfermedad del SIDA. Ahora que tratamientos crónicos prolongados con los fármacos antiretrovirales han hecho desaparecer los síntomas comunes de la infección por el HIV y han mejorado la calidad de vida de pacientes de SIDA, los efectos adversos de dichos fármacos están siendo identificados y caracterizados. En la era de la terapia HAART, aparecen nuevos retos en lo que concierne a la terapia antiretroviral: Elucidar los mecanismos de toxicidad, dirigir y controlar los efectos adversos y diseñar nuevos fármacos antiretrovirales que presenten una menor toxicidad.

II. 2. 2. EL SÍNDROME DE LA LIPODISTROFIA ASOCIADA A HAART

La lipodistrofia asociada a HAART fue descrita por primera vez hace cinco años en varios informes que describían procesos de pérdida de grasa subcutánea en la cara y brazos de pacientes VIH positivos tratados con el inhibidor de proteasa indinavir. Estas alteraciones recordaban a algunas lipodistrofias congénitas y adquiridas ya descritas. (Garg, 2000), (Viraben and Aquilina, 1998), (Lo et al., 1998), (Carr et al., 1998a). Desde entonces, numerosos estudios clínicos han revelado que un uso prolongado de la terapia HAART se asocia con fenómenos de **lipodistrofia** (alteraciones en la distribución de la grasa corporal) (Carr and Cooper, 2000) y **alteraciones metabólicas** asociadas (Periard et al., 1999). La prevalencia de al menos una de las alteraciones relacionadas con la lipodistrofia se ha estimado en un 50% después de más de un año de terapia antiretroviral (Carr et al., 1999), aunque el rango de prevalencias difiere entre un 18 y un 83%. Estas diferencias radican en el hecho que aún no existe una definición operativa del síndrome, además de que no se sistematizan la edad, el sexo y el tipo y duración del tratamiento de los pacientes incluidos en los estudios.

Las características clínicas más importantes de la **lipodistrofia** asociada a HAART son una pérdida de tejido adiposo periférico (lipoatrofia) de la cara, piernas, brazos y nalgas, acompañada de una acumulación central de grasa, preferentemente en el abdomen, en la zona de la nuca (las denominadas "*buffallo humps*" o gibas de búfalo), en las glándulas mamarias, en las mujeres, y con aparición de otros lipomas (Lo et al., 1998), (Carr et al., 1998a), (Carr and Cooper, 2000). Las **alteraciones metabólicas** asociadas incluyen niveles elevados de triacilglicéridos (TG), colesterol asociado a lipoproteínas de baja densidad (LDL) y a lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), apolipoproteína B y E y niveles bajos de colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad (HDL). También presentan resistencia a la insulina (con niveles elevados de péptido C y una alta concentración de insulina) y diabetes mellitus de tipo II (Carr et al., 1999; Gervasoni et al., 1999; Dube et al., 1997; Walli et al., 1998). **Tabla 4**

Tabla 4. Características del síndrome de la lipodistrofia asociada a HAART

Características **clínicas**

- Lipoatrofia periférica: cara, brazos, piernas y nalgas
- Acumulación central de grasa: intrabdominal, dorsocervical, mamas y otros lipomas

Alteraciones **metabólicas**

- Hipertrigliceridemia
 - Hipercolesterolemia
 - Resistencia a la insulina
 - Diabetes Mellitus tipo II/ tolerancia a la glucosa alterada
 - Acidemia láctica
-

Este perfil de alteraciones lipídicas inducido por la terapia HAART dibuja en los pacientes un perfil aterogénico que constituye una situación de alto riesgo cardiovascular de tipo isquémico (Periard et al., 1999; Domingo et al., 1999b). Adicionalmente, las alteraciones en la morfología corporal inducidas por la lipodistrofia nos retrotraen a la situación de la epidemia por VIH, en el que el aspecto externo del paciente suponía un estigma que delataba la enfermedad de la que se hallaba afecto, con todos los problemas que ello puede conllevar desde la discriminación social, sexual y profesional. La imposibilidad actual de tratar la lipodistrofia y los riesgos asociados que conlleva, amenazan la efectividad del tratamiento antiretroviral, ya que los pacientes se sienten desalentados y abandonan sus tratamientos.

II. 2. 3. ETIOPATOGENIA DE LA LIPODISTROFIA ASOCIADA A HAART

La etiopatogenia de la lipodistrofia asociada a HAART es aún desconocida, pero se han planteado varios mecanismos de toxicidad de los fármacos anti-VIH que probablemente estén asociados y estén actuando de manera sinérgica en el desarrollo de este síndrome.

Una de estas explicaciones sería la similitud entre la lipodistrofia asociada a HAART y el síndrome de Cushing, síndrome que se caracteriza por un exceso de glucocorticoides y que tiene como característica morfológica típica acumulaciones de tejido adiposo en la región dorso-cervical, las denominadas "*buffalo humps*". Los estudios de Lo JC *et al* excluyeron el síndrome de Cushing como el causante de dichas acumulaciones de grasa en pacientes HIV positivos en tratamiento antiretroviral (Lo et al., 1998). Otro mecanismo podría ser que la acumulación de grasa sería la consecuencia de la recuperación del apetito después de suprimir la replicación del VIH, pero este proceso no explicaría los fenómenos de lipoatrofia. Asimismo, la etiología de este síndrome no parece estar basada en la infección por VIH, ya que se observa de manera preferente en pacientes sometidos a HAART, que el grado de lipodistrofia es independiente de la carga viral en plasma (Carr et al., 1999) y que la lipodistrofia se da en pacientes recién infectados que reciben HAART (Miller et al., 2000).

Este síndrome apareció cuando se generalizó el uso de los inhibidores de la proteasa, por lo que en un principio se relacionó con el uso pernicioso de los PIs (Graham, 2000), pero pronto aparecieron estudios que evidenciaban que pacientes que recibían NRTIs pero que nunca habían tomado PIs también desarrollaban lipodistrofia (Carr and Cooper, 2000; Madge et al., 1999).

El uso de los inhibidores de la proteasa vírica parece estar fuertemente asociado con la acumulación de grasa visceral y con los componentes metabólicos del síndrome, caracterizados por los fenómenos de incremento en los niveles de TG, lipoproteínas ricas en TG y resistencia a la insulina. Este hecho se basa en que estas alteraciones se han descrito después de tratamientos cortos con PIs a individuos sanos (Purnell et al., 2000; Noor et al., 2001) y después de la introducción de PIs a los regímenes de tratamiento de pacientes VIH positivos (Rakotoambinina et al., 2001; Vigouroux et al., 1999). Por otro lado, mientras los inhibidores de transcriptasa reversa análogos de nucleósidos juegan un papel más importante en la pérdida de grasa periférica (Carr et al., 2000; Saint-Marc et al., 1999), parece que no tienen tanto efecto sobre el

Introducción

metabolismo lipídico y la sensibilidad a la insulina. Las alteraciones del metabolismo glucídico y lipídico no están sistemáticamente asociadas a alteraciones en la grasa corporal, aunque estos aspectos estén ligados en lo que a epidemiología y posible patofisiología se refiere (Rakotoambinina et al., 2001).

Un concepto importante que ha surgido de los ensayos clínicos es que cuando los PIs y los NRTIs se combinan en terapia HAART, su introducción resulta ser una potente arma de predicción de lipodistrofia, aumentando mucho el riesgo si se compara con el uso de PIs o NRTIs por separado (Mallal et al., 2000). Además, se han descrito otros factores ligados al desarrollo de la lipodistrofia asociada a HAART como son la duración del tratamiento (Carr et al., 1999; Rakotoambinina et al., 2001; Mallal et al., 2000; Seminari et al., 2002), los valores de células T CD4 (Seminari et al., 2002), la edad (Seminari et al., 2002; Mallal et al., 2000), los niveles elevados de péptido C y de TG (Carr et al., 1999; Rakotoambinina et al., 2001), el estatus nutricional (Rakotoambinina et al., 2001) y la coinfección por el virus de la hepatitis C (VHC) (Duong et al., 2001).

Desde que se publicó el primer informe sobre los efectos adversos de los fármacos anti-VIH, se han propuesto diferentes mecanismos patofisiológicos por los cuales los fármacos antiretrovirales estarían dando lugar al síndrome de la lipodistrofia asociada a HAART. Brevemente, estas son las distintas hipótesis que se han planteado:

- El primer mecanismo hipotético presentado por Carr *et al.* (Carr et al., 1998b) sugería que los PIs, por homología de secuencia, podrían estar inhibiendo la función de la proteína relacionada con el receptor de la lipoproteína lipasa (LRP o *low density lipoprotein-receptor-related protein*), la proteína citoplasmática de unión a ácido retinoico-1 (CRABP-1) y la familia del citocromo P450 3A. Esto daría lugar a una inhibición de la diferenciación de los adipocitos, una alteración en la captación y reserva de TG y una inducción de apoptosis, favoreciendo la acumulación de grasa en adipocitos viscerales y provocando resistencia a la insulina. Sin embargo, esta hipótesis aún no ha sido confirmada, pero sí que se ha descrito que los PIs parecen estar interfiriendo la función de SREBP-1, un factor de transcripción clave en la diferenciación adipocitaria (Bastard et al., 2002; Dowell et al., 2000; Nguyen et al., 2000).
- Un segundo mecanismo de toxicidad de los fármacos anti-VIH se centraba en la toxicidad mitocondrial de los NRTIs sobre el adipocito y sugería que dichos fármacos inhibirían la función de la DNA polimerasa- γ produciendo

una depleción del DNA mitocondrial y una consecuente disfunción del orgánulo (Brinkman et al., 1999).

- Una tercera posibilidad sería la participación de diferentes citoquinas en el síndrome de lipodistrofia. De hecho, la terapia HAART parece que altera la producción de citoquinas en células T de pacientes infectados (Ledru et al., 2000) y está asociada con una alteración en la producción de citoquinas en tejido adiposo de pacientes (Bastard et al., 2002) (Bastard et al., 2003) y en adipocitos en cultivo (Jones et al., 2003).

II.2.3.1. La aportación de los PIs a la lipodistrofia asociada a HAART.-

Como ya se mencionó anteriormente, el uso a largo plazo de los PIs en la terapia HAART contribuye enormemente al desarrollo del "síndrome metabólico" asociado a la lipodistrofia asociada a HAART. Numerosos estudios clínicos han demostrado que la terapia con PIs está fuertemente asociada a fenómenos de dislipidemia y resistencia a la insulina (Vigouroux et al., 1999; Bonnet et al., 2001; Behrens et al., 1999; Berthold et al., 1999) y que el uso de PIs a corto plazo es suficiente para causar estas alteraciones incluso en ausencia de los cambios en la composición corporal propios del síndrome de la lipodistrofia (Mulligan et al., 2000).

Dada la complejidad de los estudios *in vivo* y el hecho que en general los pacientes de SIDA reciben una combinación de fármacos, se han realizado muchos estudios *in vitro*, utilizando líneas celulares de adipocitos blancos como la línea celular 3T3-L1 o la 3T3F442A, entre otras, para analizar el efecto directo de los fármacos anti-VIH sobre la diferenciación y funcionalidad del tejido adiposo.

En estudios a corto plazo de adipocitos en cultivo, se ha demostrado los efectos directos de inhibición del PI indinavir sobre la captación de glucosa estimulada por la insulina, independiente de los procesos de señalización de la insulina (Murata et al., 2000; Murata et al., 2002; Ben Romano et al., 2003). Por el contrario, en otro estudio, 18 horas de incubación con el PI nelfinavir inhibe la señalización de la insulina en adipocitos en cultivo (Rudich et al., 2001).

En estudios a largo plazo (varios días), se ha demostrado que varios PIs son capaces de inhibir la diferenciación adipocitaria en diferentes modelos *in vitro*. Estudios con la línea celular transformada de preadipocitos 3T3-L1 tratados con varios PIs demuestran que éstos son capaces de bloquear la diferenciación adipocitaria y que este bloqueo no es a través de la inhibición directa de la acción del factor de transcripción PPAR γ (Zhang et al., 1999). Otro estudio realizado en preadipocitos

humanos en cultivo primario muestra que los PIs indinavir y saquinavir inhiben la diferenciación de estas células y lo hacen a través de un mecanismo independiente de la vía PPAR γ -RXR (Wentworth et al., 2000). En otro trabajo de Lenhard JM, *et al.* se demuestra que algunos PIs bloquean la adipogénesis y estimulan el catabolismo de los ácidos grasos en células mesenquimales CH310T1/2 inducidas a diferenciarse a adipocitos. De nuevo, este bloqueo no se debe a que los PIs estén actuando como ligandos antagonistas de PPAR γ o RXR α (Lenhard et al., 2000a).

El potencial de los distintos PIs para inhibir la diferenciación adipocitaria difiere según la molécula y también según la presencia o ausencia, durante el proceso de diferenciación del adipocito, de un agonista PPAR γ , familia de las tiazolidindionas (TZDs). Los efectos deletéreos de algunos PIs se revierten completamente con la adición de una TZD, indicando que la acción del PI es anterior a la aparición en escena de PPAR γ , mientras que para otros PIs la presencia de una TZD revierte sólo en parte su efecto, sugiriendo que podrían estar actuando a otro nivel, después de PPAR γ . Es interesante destacar que la inhibición de la diferenciación y lipogénesis de células 3T3-L1 por los PIs indinavir y ritonavir puede amplificarse con el tratamiento con TNF- α (Agrawal et al., 2001). Adicionalmente, algunos PIs inducen resistencia a la insulina y apoptosis de los adipocitos, efectos que se pueden revertir en presencia de una TZD (Caron et al., 2001a).

Estos estudios *in vitro* han permitido identificar **SREBP-1** (*sterol regulatory element-binding protein-1*) como un factor de transcripción candidato a mediar los efectos de los PIs sobre la diferenciación adipocitaria. Se ha visto que varios PIs alteran (incrementan o disminuyen) los niveles de SREBP-1 maduro en células 3T3F442A (Caron et al., 2001a) y en células 3T3-L1 (Dowell et al., 2000; Nguyen et al., 2000), pero en ambos casos, esto resulta en un bloqueo de la expresión de genes que SREBP-1 regula, como la FAS, así como de los genes adipogénicos PPAR γ y C/EBP α (Dowell et al., 2000; Nguyen et al., 2000; Caron et al., 2001). En concordancia con estos resultados, indinavir es capaz de inhibir la activación de la LPL y la FAS, dos genes dependientes de la activación por SREBP-1, en modelos *in vitro* (Miserez et al., 2002). La localización celular alterada de SREBP-1 inducida por varios PIs en adipocitos 3T3F442A se ha visto que es debida a una alteración en la incorporación de dicho factor de transcripción en el núcleo (Caron et al., 2001b) (Caron et al., 2002). SREBP-1 interacciona con la proteína nuclear lamina A/C, proteína que pertenece a la lámina nuclear (Lloyd et al., 2002). Se ha visto que algunos PIs inducen fragilidad nuclear y dan lugar a núcleos con alteraciones en la distribución de lamina A/C y B. Estos núcleos son incapaces de acumular SREBP-1. Además, los PIs inhiben la

maduración de la prelamina a lamina A. Estas alteraciones nucleares se observan en células de pacientes con lipodistrofia parcial familiar (FPLD), una forma monogénica de lipodistrofia severa, con resistencia a la insulina, causada por mutaciones en el gen de la lamina A/C (Vigouroux et al., 2001). Con todo esto, algunos PIs podrían estar alterando la maduración de la lamina A/C e induciendo la disrupción de la arquitectura del núcleo, *in vitro* (Caron et al., 2003a). Este proceso sería el responsable de la localización alterada de SREBP-1 en el núcleo y de la consecuentemente disfunción adipocitaria.

II.2.3.2. La aportación de los NRTIs a la lipodistrofia asociada a HAART.-

El fenotipo de la lipodistrofia que se observa en pacientes que no reciben PIs pero sí NRTIs difiere en algunos aspectos de la lipodistrofia asociada con el tratamiento con PIs. La pérdida de grasa subcutánea aparece como una manifestación dominante (Polo et al., 2000) y aunque se ha observado algún incremento débil en la adiposidad visceral en algunos estudios clínicos (Saint-Marc et al., 1999), la magnitud de este efecto es mucho menor que lo que se observa en la lipodistrofia asociada a los PIs (Miller et al., 1998) y no parece estar influida por la elección del NRTI (Law et al., 2000).

Relativamente pocos estudios han analizado los efectos de los NRTIs sobre los adipocitos. Estudios *in vitro* realizados por Dowell *et al.* muestran que el NRTI estavudina solo, o en combinación con indinavir, ritonavir o saquinavir no altera la acumulación de lípidos en adipocitos 3T3-L1 (Dowell et al., 2000). Al contrario, el grupo de Roche *et al.* utilizando adipocitos 3T3F442A ven que los NRTIs pueden interferir en la diferenciación adipocitaria aunque en menor grado que los PIs (Roche et al., 2002). Cuando los PIs y los NRTIs se combinan, los efectos que se consiguen son diferentes de los que cada fármaco produce por separado. En los estudios de Caron *et al.* se observa que adipocitos 3T3F442A expuestos crónicamente a estavudina o zidovudina ven disminuido el contenido lipídico y incrementada ligeramente la apoptosis, además de que la zidovudina induce resistencia a la insulina (Caron et al., 2003b). También este grupo ha observado que la TZD rosiglitazona previene casi totalmente los efectos adversos de los NRTIs en células adiposas, tanto si se utiliza sola o en combinación con PIs (Caron et al., 2001a).

Por lo tanto, *in vitro*, los NRTIs, en concentraciones clínicas relevantes, tienen un efecto mucho menos marcado sobre la función del adipocito que los PIs y tienen diferentes potencias dependiendo de la molécula. Esto está en la línea de lo que se conoce de la lipoatrofia relacionada con los NRTIs. Además, se observa que la

asociación de NRTIs y PIs es más deletérea que los NRTIs solos, hecho que también está en acuerdo con los datos observados en pacientes VIH positivos.

Acerca de los NRTIs, es necesario destacar que la concentración intracelular de cada uno y su consecuente actividad va a depender del transporte del fármaco hacia el interior de la célula y de la mitocondria, y del metabolismo celular que cada fármaco sufra específicamente (Kakuda, 2000). Sobre el transporte de los NRTIs al interior celular, este proceso es esencialmente tan o más importante como la fosforilación de estos compuestos para que sean farmacológicamente activos, ya que el transporte hacia el citosol o hacia la matriz mitocondrial determinará la cantidad de NRTIs potencialmente activos y a la vez tóxicos. Existen varios sistemas de transporte de nucleósidos naturales, a nivel de la membrana plasmática, que sería a través de los cuales los análogos de nucleósidos antivirales podrían entrar en la célula. Estos sistemas difieren en su especificidad de sustrato (análogos pirimidínicos o purínicos) y en sus propiedades termodinámicas (pueden ser equilibrativos o concentrativos), además de que se ha observado que estos transportadores pueden mostrar un patrón de expresión tisular específico que afectará a su acción farmacológica (Pastor-Anglada et al., 1998). Por lo que al transporte de los NRTIs al interior de la mitocondria se refiere, se ha observado que los análogos de nucleósidos antivirales pueden ser transportados intramitocondrialmente en la forma fosforilada o sin fosforilar a través de proteínas que tienen como función transportar di y tri-fosfatos hacia la matriz mitocondrial. Recientemente se ha caracterizado un transportador mitocondrial de deoxinucleótidos (DNC o *deoxynucleotide carrier*) que suministra los precursores para la síntesis del mtDNA. Este transportador, que se ha observado que transporta con mucha eficiencia dideoxinucleótidos, se ha propuesto que jugaría un papel importante en la incorporación de los NRTIs al interior de la mitocondria (Dolce et al., 2001).

Una vez los análogos de nucleósidos antivirales han entrado en la célula, éstos deben ser fosforilados para realizar su función y la cascada de fosforilaciones varía según cada fármaco (Kakuda, 2000). Quinasas celulares son las responsables de la fosforilación de los 2', 3'- NRTIs como el AZT, d4T, ddC, entre otros. La fosforilación de los NRTIs pirimidínicos se lleva a cabo intracelularmente en tres pasos y esta fosforilación puede ser tanto citosólica como mitocondrial. El primer paso de fosforilación lo realiza la timidina quinasa (TK) y parece ser un enzima clave en la toxicidad de estos fármacos. Existen dos isoformas de la TK, la TK1 que se localiza en el citoplasma y la TK2 que es mitocondrial, y difieren en sus capacidades para fosforilar a diferentes NRTIs, así como en el hecho que se expresan diferencialmente según se trate de tejidos mitóticamente activos o diferenciados (Lewis et al., 2003).

La inducción de la depleción del DNA mitocondrial por los NRTIs se ha demostrado que está implicada en varias reacciones adversas relacionadas con procesos de toxicidad mitocondrial, como miopatía, esteatosis hepática y acidosis láctica, que ocurren ocasionalmente en pacientes infectados por el VIH (Brinkman et al., 1999; Ogedegbe et al., 2003) (Lewis and Dalakas, 1995). Por lo tanto, se ha hipotetizado que, disminuyendo la cantidad de mtDNA en el tejido adiposo blanco, los NRTIs juegan un papel en la patogénesis de la lipodistrofia (Brinkman et al., 1999). Esta hipótesis también se basa en el hecho que pacientes con enfermedades mitocondriales congénitas que presentan una distribución anormal de la grasa corporal, presentan mutaciones en el mtDNA (Klopstock et al., 1994; Gamez et al., 1998) (ver apartado I.2.4).

Recientemente se han llevado a cabo varios estudios clínicos que describen niveles de mtDNA bajos en tejido adiposo blanco de pacientes tratados con diferentes NRTIs (Shikuma et al., 2001; Walker et al., 2002; Nolan et al., 2003; Cherry et al., 2002), proporcionando importantes datos *in vivo* del efecto de los NRTIs sobre el tejido diana de la lipodistrofia. Cabe destacar que en dos de estos estudios encuentran una asociación entre depleción del mtDNA en grasa subcutánea y lipoatrofia (Shikuma et al., 2001; Walker et al., 2002), mientras que en los otros dos esta asociación no es clara (Nolan et al., 2003; Cherry et al., 2002). La falta de asociación en estos estudios no está clara, aunque podría ser debido a que el diseño de los estudios no es longitudinal. Asimismo, el análisis ultraestructural de los adipocitos de estos pacientes ha demostrado que estas células presentan mitocondrias con formas anormales, así como un interesante incremento en el tamaño y número de mitocondrias (Nolan et al., 2003; Lloreta et al., 2002; Walker et al., 2002). Además, el estudio realizado por Nolan *et al.* muestra una correlación entre depleción del mtDNA y masa mitocondrial incrementada (Nolan et al., 2003), consistente con el hecho que enfermedades genéticas caracterizadas por depleción del mtDNA también presentan proliferación de mitocondrias (Johnson et al., 2004). En otro trabajo realizado por Hammond *et al.* se muestra que el tejido adiposo subcutáneo de pacientes tratados con NRTIs presenta depleción del mtDNA y toxicidad mitocondrial del tejido asociada (Hammond et al., 2003).

II.2.3.3. Estudios de pacientes HIV con lipodistrofia asociada a HAART.-

Existen algunos estudios que analizan directamente el tejido adiposo de pacientes infectados con el VIH. En el trabajo de Bastard *et al.* los pacientes con lipoatrofia presentan en su tejido adiposo subcutáneo una proporción de adipocitos pequeños

mayor que en grasa subcutánea de individuos sanos. Además, la grasa de dichos pacientes presenta unos niveles bajos del mRNA de los factores de diferenciación adipocitaria C/EBP α y β , PPAR γ y SREBP-1c (Bastard et al., 2002). Como *in vitro* se ha observado que el factor de diferenciación SREBP-1c es una diana de los PIs, estas observaciones *in vivo* sugieren que SREBP-1c podría jugar algún papel en la lipoatrofia periférica típica de la lipodistrofia asociada a HAART.

En otro estudio realizado por Kannisto *et al.* se compara tejidos adiposo subcutáneo de pacientes en terapia HAART con lipodistrofia con pacientes tratados sin lipodistrofia. La grasa de los pacientes con lipodistrofia presenta unos niveles más bajos de los mensajeros de los factores de transcripción PPAR γ , δ y SREBP-1c, así como del coactivador PGC-1 α , que regula procesos de mitocondriogénesis. Además, los mRNA de la IL-6 y de CD45, marcador común de la célula leucocitaria, se encuentran aumentados respecto a los pacientes no lipodistróficos (Kannisto et al., 2003).

II.2.3.4. Posible papel del ácido retinoico en la lipodistrofia asociada a HAART.-

A parte de los efectos adversos ya descritos de los inhibidores de la proteasa, existen varias alteraciones, como son defectos en la piel, uñas y pelo (Behrens et al., 2000; Bourezane et al., 1999; Garcia-Silva et al., 2000), que recuerdan muy claramente a los conocidos efectos adversos de las terapias sistémicas con **retinoides** (Saurat, 1992; Padberg et al., 1999). Estas similitudes entre el tratamiento con retinoides y la terapia HAART, especialmente cuando se incluye un PI en el régimen, sugieren que algunos agentes antiretrovirales podrían afectar el metabolismo de la vitamina A (retinol), causando un incremento en los niveles de retinol o ácido retinoico o alterando la vía de señalización mediada por los retinoides. Carr *et al.* ya propuso en su momento que los PIs podrían interferir en el metabolismo de los retinoides y en el metabolismo lipídico (Carr et al., 1998a). Un estudio realizado en células mesenquimales CH310T1/2 demuestran que el PI indinavir es capaz de estimular la acción del ácido *all-trans* retinoico sobre estas células, ya sea estimulando la actividad de la fosfatasa alcalina (proteína regulada por retinoides) o potenciando la inhibición del *all-trans* RA sobre de la diferenciación adipocitaria de dichas células (Lenhard et al., 2000b). Sugieren que esta acción del indinavir sería a través de la activación del heterodímero RAR/RXR, quizás mediante el desplazamiento del *all-trans* RA de la proteína CRABP-1. En otro estudio realizado por Toma *et al.* se muestra que los niveles de retinol en plasma de pacientes VIH positivos tratados no se encuentran elevados (sino más bien disminuidos), por lo que no podrían explicar la presencia de

determinados efectos adversos observados en pacientes recibiendo HAART (Toma et al., 2001). Por otro lado, en células derivadas de riñón de cerdo observan que varios PIs incrementan la actividad de la RALDH (enzima encargado de la transformación del retinal a ácido retinoico) y el indinavir es capaz de inducir su expresión. Estos resultados sugieren que una mayor concentración de ácido retinoico podría ser la responsable de los ya mencionados efectos adversos.

II.2.3.5. La participación de la citoquinas proinflamatorias en la lipodistrofia asociada a HAART.-

Las citoquinas inflamatorias, incluidas TNF- α , IL-1, IL-6 y IFN- α , son inhibidores de la diferenciación adipocitaria *in vitro* (sección 1.1.1) y podrían estar jugando algún papel en la atrofia del tejido adiposo y la resistencia a la insulina que se observa en los pacientes infectados por el VIH que reciben la terapia HAART.

En pacientes obesos y diabéticos, así como en pacientes VIH positivos con lipodistrofia, se ha descrito que el tejido adiposo tiene alterada su habilidad para secretar adipocitoquinas. Esta secreción alterada también se ha observado en adipocitos tratados con PIs. En varios análisis de biopsias de grasa obtenidas de pacientes lipodistróficos bajo tratamiento con PIs y NRTIs, se ha observado una expresión incrementada de TNF- α y IL-6, mientras que la expresión de adiponectina y leptina se ve disminuida (Bastard et al., 2002; Johnson et al., 2004; Lihn et al., 2003; Sutinen et al., 2003) (Bastard et al., 2003). Asimismo, la secreción de IL-6 del tejido adiposo abdominal subcutáneo y los niveles de IL-6 en plasma se asocian positivamente con la grasa visceral y negativamente con la cantidad relativa de grasa de las extremidades inferiores (Johnson et al., 2004). A parte de esto, Jones *et al.* ha demostrado que algunos PIs son capaces de incrementar la expresión de TNF- α y disminuir la de adiponectina en adipocitos 3T3-F442A (Jones et al., 2003).

Se ha observado que en tejido adiposo de pacientes bajo terapia HAART, que incluye PIs y NRTIs, hay un incremento de los niveles de apoptosis, dato a favor de la pérdida de adipocitos en la grasa de dichos pacientes (Domingo et al., 1999a). La apoptosis de las células adiposas persistía cuando los pacientes pasaban a recibir el NNRTI nevirapina en vez de PIs (Domingo et al., 2001), pero cuando el d4T era substituido por AZT, entonces la apoptosis se reducía aunque se mantenía más alta que en los controles (Thompson et al., 2003). Siguiendo con esta línea, se ha observado una relación entre el grado de apoptosis y la expresión del mRNA de TNF- α y IL-6 en el tejido adiposo de pacientes tratados (Bastard et al., 2003). Recientemente, Jan *et al.* han demostrado que el tejido adiposo de pacientes HIV con

lipoatrofia asociada al tratamiento, presenta niveles de apoptosis elevados así como una diferenciación adipocitaria disminuida. Los niveles elevados de TNF- α y IL-6 presentes en estos pacientes podrían ser los responsables de estos efectos (Jan et al., 2004). Todos estos datos estarían a favor del papel de la terapia antiretroviral en la apoptosis de los adipocitos, que sería el resultado de una sobreexpresión de citoquinas inducida por HAART además de una disfunción mitocondrial.

II. 2. 4. LIPOMATOSIS ASOCIADA A HAART

Una de las alteraciones características del síndrome de la lipodistrofia asociada a HAART es la aparición, en un subconjunto de los pacientes, de lipomatosis, típicamente caracterizada por acumulaciones de grasa en la región dorsocervical, comúnmente denominadas gibas de búfalo ("*buffallo humps*") (Lo et al., 1998). Se ha estimado una prevalencia de aparición de gibas de búfalo del 6% entre los pacientes tratados con HAART (Heath et al., 2001).

Existe una similitud muy interesante entre el síndrome de las gibas de búfalo asociado a HAART y la lipomatosis simétrica múltiple (MSL) de tipo 1, una enfermedad de origen diverso, incluyendo el mitocondrial (Klopstock et al., 1997), que se caracteriza por un desarrollo masivo de grandes lipomas sin encapsular localizados principalmente en el tejido adiposo subcutáneo del cuello, hombros y otras regiones axiales. Los lipomas de MSL están formados por una mezcla de células adiposas uni y multivacuolares que recuerdan más a un adipocito marrón que a un adipocito blanco típico, además de que éstas células expresan marcadores específicos del adipocito marrón (Nisoli et al., 2002; Vila et al., 2000). La toxicidad mitocondrial asociada a HAART y la parecida distribución anatómica han llevado a plantear la hipótesis de que el síndrome de las gibas de búfalo asociado a HAART y MSL podrían ser variantes de la misma alteración metabólica y tendrían mecanismos etiopatológicos comunes (Urso and Gentile, 2001; Cossarizza et al., 2001).

OBJETIVOS

Al inicio de la presente Tesis y a partir de varias evidencias previas, se planteaba la posibilidad de que alteraciones en la diferenciación blanco/marrón del adipocito podrían estar implicadas en las alteraciones del tejido adiposo asociadas a la terapia HAART. Un primer objetivo fue por tanto:

- **Establecer la potencial implicación del adipocito marrón en la lipomatosis asociada a la terapia HAART mediante el análisis de la expresión del gen marcador UCP1.**

Los datos positivos en cuanto a la implicación del adipocito marrón en la lipomatosis asociada a HAART, así como la consideración de dicho tipo celular como óptimo para el estudio de la toxicidad mitocondrial y otros efectos de los fármacos antiretrovirales, nos hizo plantear como objetivo global el análisis de la acción de éstos fármacos en el adipocito marrón. Ello requería una primera caracterización de aspectos clave de la regulación de la biogénesis mitocondrial a nivel molecular en estas células. Por ello, los dos siguientes objetivos fueron:

- **Establecer la regulación de la expresión génica de factores de transcripción mitocondriales B1 y B2 y del co-activador PGC-1 α en el contexto de la diferenciación del adipocito marrón y la biogénesis mitocondrial, y en respuesta a agentes hormonales.**
- **Establecer los efectos de fármacos antiretrovirales inhibidores de la transcriptasa reversa sobre el adipocito marrón mediante el análisis de su diferenciación y expresión génica en relación con la función mitocondrial.**

Por último, creímos interesante abordar la posibilidad de extender este estudio a la potencial utilización de un modelo celular lo más próximo posible al adipocito humano e iniciar un primer análisis de su utilidad para el estudio de los mecanismos de acción de los fármacos antiretrovirales. Por ello, se planteó también como objetivo:

- **Desarrollar un modelo celular de adipocitos humanos en cultivo primario y utilizarlo en el análisis del efecto del fármaco antiretroviral didanosina.**