



UNIVERSITAT DE BARCELONA
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
Facultat de Biologia
Programa de doctorat de Biomedicina
Bienni 2003-2005

**ESTUDI DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA AL TEIXIT ADIPÓS EN
LIPODISTRÒFIES CONGÈNITES I ASSOCIADES A LA
INFECCIÓ PER HIV-1**

Memòria presentada per optar al títol de Doctor per la Universitat de Barcelona per en
Jordi Pere Guallar i Morillo

Dr. Francesc Villarroya Gombau

Professor Titular de Bioquímica i
Biologia Molecular

Dra. Marta Giralt Oms

Professora Titular de Bioquímica
i Biologia Molecular

No sabia dir quan va ser el primer cop que ho vaig sentir a dir, però una frase molt repetida és que durant la vida de cadascú, tothom hauria de plantar un arbre, escriure un llibre i tenir un fill (o filla, siguem políticament correctes). Digueu-me agosarat, però jo diria que ja n'he aconseguit dues, i abans que hi hagi algú que comenci a fer conyes al respecte, em referia a les dues primeres. El fet de plantar un arbre (era un pi, però posar-ho donaria lloc a confusions un pèl escatològiques), no sé si haurà tingut cap transcendència important, tot i que avui en dia amb tant d'efecte hivernacle, qui sap? Per descomptat, tenir descendència fa l'efecte d'haver de marcar “una mica” la vida d'una persona, sobretot, segons assegurin certes fonts fiables consultades. Tot i així, de moment deixaré l'exploració d'aquest punt per d'aquí uns quants anys. El què ara sí sé del cert és que escriure un llibre, o en aquest cas una tesi, és tota una experiència. No pel què suposa simplement escriure-la, que Déu ni do, sinó més aviat pel conjunt de vivències acumulades al llarg d'aquests anys, que han estat realment tota una pila d'adjectius, d'entre els quals en destacaria “genials”. És per això que m'agradaria agrair amb les següents línies a tots els que d'una manera o altre han estat partícips d'aquests bons moments.

En primer lloc, m'agradaria donar gràcies a tots els de casa, sense el suport i el carinyo dels quals, de ben segur que aquesta tesi no hauria arribat a bon port.

També vull agrair al Francesc i a la Marta l'oportunitat que em van oferir per poder realitzar aquesta tesi quan em van acollir al seu laboratori. M'heu ajudat i he après molt al vostre costat. Moltes gràcies de tot cor.

Així mateix, no voldria deixar d'agradar a l'Octavi, a la Teresa i a la Roser tots els consells i l'ajuda proporcionada, són tres persones que sempre han tingut la porta oberta per mi.

Part d'aquesta tesi també ha estat possible gràcies a l'ajuda d'en Joan Carles i en Pere Domingo. Crec que la interacció entre el quiròfan i el laboratori ajuda molt a prendre consciència real de la desgràcia que representa, a nivell humà, patir els efectes de la SIDA i totes les seves afeccions associades.

No puc deixar de dedicar un espai a un bon col·lega i millor amic, en Jesús “Completo Harry”. Ell va ser el meu primer “Sensey”, amb qui no vaig aprendre a fer anar la katana (que també en sap), però sí vaig aprendre a fer les primeres passes en el món de la ciència a la mítica planta 14 de l'hospital de la Vall d'Hebron. Amb ell, amb en Pep i la Marta vam passar molt bones estones al laboratori i fora del laboratori.

L'arribada al TAM va ser immillorable, el somni de qualsevol tiu: un laboratori ple de ties!!! Malauradament, des que vaig arribar jo, la tendència s'ha anat capgirant. La primera que vaig conèixer i la primera que va marxar

(espero no ser-ne la causa) va ser la Mònica, és una de les persones amb més carisma i sentit de l'humor que conec. Amb la Neus també m'he fet tips de riure, és una persona que val molt. Seguint amb la saga, la següent "Sensey" d'un servidor va ser la Marisa, que va tenir la paciència d'ensenyar-me "bastantes" cosetes i amb qui he compartit bons moments. La Pili i la Gemma sempre han estat fonts inesgotables de bons consells i bons records. Realment Pili, tu saps que m'has deixat records inesborrables; sembla mentida el poder que poden tenir unes simples malles (no em matis després de llegir això, si us plau). Una altra persona que ja va sortir de "la madriguera" és la Yoli, tot i que no tinc clar si va sortir-ne o va anar a perllongar el període d'hibernació a Estocolm. Si és impossible enfadar-se amb alguna persona, aquesta és la Yoli, sempre disposada a donar-te un cop de mà quan el necessitis. Finalment, dins d'aquest "grupillo" també hi hauria el nostre "sabor cubano" particular, l'Elita, una altra persona que val el seu pes en or i en qui sempre he pogut confiar per qualsevol cosa.

Al mateix temps que jo o quasi igual, també va entrar en Jordi i l'Emmanuel. Quins tres ens vam ajuntar! Amb ells dos he protagonitzat les coses més increïbles que es poden fer dins d'un laboratori, i no precisament relacionades amb la ciència. Millor que ho deixi aquí, encara que no cal dir que m'emporto records vostres genials. Dins del pack francès també va arribar la Carine, amb qui els riures, consells i ànims han estat a l'ordre del dia. De la mateixa manera, amb la Txell Rosell, no són poques les històries per explicar: des de cursos de doctorat a activitats "lúdico-festives" (pregunteu-ho al DJ de la sala Apollo); amb aquest tros de dona he passat molt bons moments. El Ramon és un tiu collonut, i de per sí, inquiet (molt inquiet): ha inventat diferents modalitats per travessar cruïlles amb bicicleta i, sobretot, la tècnica del doble guant (supervivència d'alta muntanya); hem passat molt bons moments també.

Per altra banda el lab ha fitxat dues noves incorporacions amb les que segur que "se va a haber un follón...": l'Albert i en Josemi. Albert (alias "Viemo", o també "Viejo" em sembla), merci pels cursos de reorientació i descoberta musicals, ets un tiu que vals moltíssim i amb qui he passat estones genials. No sent menys, d'en Josemi se'n poden esperar les coses més increïbles: per exemple, ara mateix, els isards del Pedraforca poden dir l'hora als turistes gràcies a certa despenjada tartera avall. Et desitjo molta sort en el fabulós món de la HALS. Més novatillos amb qui també hem passat bones estones són la Julieta (aplicando técnicas de salseo varias), l'Aleix (my tailor is rich...), la Marga (que ja és mig "Aussie"), la Tiona, l'Andrea i en Marc. Molta sort a tots.

Tampoc voldria oblidar-me de la gent que ha passat pel lab i que ja no hi és. Moltes gràcies a la Claudia, la Txell Granell, la Pili de la Rocha, l'Alberto, la Lide (“a llavontans”), en Joan i la Maija (Mitä Küulu!?).

Finalment també voldria donar les gràcies a tota la colla de la facultat, ja sabeu, nucli, escorça, atmosfera, satèl·lits, o com ho volgueu dir: l'Ikle, la Noe, la Núria Carcasona, l'Edu, l'Anna, la Núria Roca, la Pili, en Sergi i la Marta. Sempre m'heu donant molt pel..., vull dir..., donat molt de suport quan l'he necessitat. Pràcticament podríem dir que hem viscut junts dia a dia durant quasi 5 anys, i això està clar marca moltíssim.

Ja posats amb la parrafada, a aquestes alçades tampoc estaria de menys agrair als qui han amenitzat i han estat font d'inspiració durant les llargues hores d'escriptura: Explosions In The Sky, Built To Spill, Modest Mouse, Arcade Fire, Band Of Horses, David Thomas Broughton, Jonathan Richman,... entre d'altres, i també a l'Afroninja.

Una abraçada a tots!!!

ÍNDEX

ÍNDEX GENERAL

Abreviatures	1
Introducció	7
HIV-1: VIRUS DE LA IMMUNODEFICIÈNCIA HUMANA	7
INTRODUCCIÓ	7
PANDÈMIA	7
HIV	9
HIV-1: ULTRAESTRUCTURA	10
HIV-1: GENOMA	11
PATOGENESI	11
CICLE DE L'HIV-1	11
SIDA	14
HAART: TERÀPIA ANTIRETROVIRAL	16
INTRODUCCIÓ	16
FÀRMACS ANTIRETROVIRALS	16
INHIBIDORS DE PROTEASA (PIs)	17
INHIBIDORS DE LA RT (RTIs)	17
Transcriptasa Reversa de l'HIV-1	17
NRTIs	17
NNRTIs	18
TRANSPORTADORS DE NUCLEÒSIDS	19
INTRODUCCIÓ	19
MECANISMES DE TRANSPORT	19
CNTs	20
ENTs	21
REGULACIÓ	21

EL TEIXIT ADIPÓS	23
INTRODUCCIÓ	23
TAB: TEIXIT ADIPÓS BLANC	24
EL TEIXIT ADIPÓS COM A ÒRGAN ENDOCRÍ	24
LEPTINA	25
INTERLEUQUINA-6	25
TNF α	25
ADIPONECTINA	26
ÀCIDS GRASSOS	26
RESISTINA	27
DIFERENCIACIÓ DEL TEIXIT ADIPÓS	28
CASCADA D'ACTIVACIÓ DE FACTORS	29
FACTORS IMPLICATS EN L'ADIPOGÈNESI	30
<i>C/EBPα</i>	30
<i>ADD1/SREBP1</i>	32
<i>PPARγ</i>	32
<i>RXR</i>	34
FACTORS ACTIVADORS DE L'ADIPOGÈNESI	35
<i>Insulina</i>	35
<i>Àcids grassos</i>	35
<i>Prostaglandines</i>	35
<i>Glucocorticoids</i>	36
FACTORS INHIBIDORS DE L'ADIPOGÈNESI	36
<i>RA</i>	36
<i>Pref-1</i>	37
<i>Wnts</i>	37
<i>GH</i>	38
<i>Altres</i>	38

TAM: TEIXIT ADIPÓS MARRÓ	38
REGULACIÓ DEL TAM	39
REGULACIÓ ADRENÈRGICA	40
<i>PGC-1α</i>	42
REGULACIÓ PER HORMONES TIROIDALS	43
REGULACIÓ PER ÀCID RETINOIC	44
EL TEIXIT ADIPÓS MARRÓ HUMÀ	46
LIPODISTRÒFIA	47
INTRODUCCIÓ	47
LIPODISTRÒFIES ADQUIRIDES	47
LIPODISTRÒFIA ASSOCIADA A L'HIV-1	47
QUADRE CLÍNIC	48
BASES PATOGÈNIQUES	48
<i>A. Toxicitat Mitocondrial</i>	49
<i>A.1. Fosforilació d'NRTIs</i>	49
<i>A.2.. Inhibició de la DNA-poly</i>	50
<i>A.3. Depleció i mutació del mtDNA</i>	51
<i>A.4.. Estrés Oxidatiu</i>	51
<i>A.5. Apoptosi</i>	51
<i>A.6. Infecció de l'HIV-1</i>	52
<i>A.7. Procés Inflamatori</i>	53
<i>B. Inhibició de l'adipogènesi</i>	53
<i>C. Estat Inflamatori</i>	54
<i>D. Lipòlisi</i>	55
LIPODISTRÒFIA PARCIAL ADQUIRIDA	55
QUADRE CLÍNIC	55
BASES PATOGÈNIQUES	56

LIPODISTRÒFIA GENERALITZADA ADQUIRIDA	56
QUADRE CLÍNIC	56
BASES PATOGÈNIQUES	57
LIPODISTRÒFIES LOCALITZADES	57
LIPODISTRÒFIA SEMICIRCULAR	57
LIPODISTRÒFIES CONGÈNITES	58
LIPODISTRÒFIA GENERALITZADA	58
QUADRE CLÍNIC	58
BASES MOLECULARS	
<i>Tipus I</i>	59
<i>Tipus II</i>	59
<i>Altres Tipus</i>	60
LIPODISTRÒFIA FAMILIAR PARCIAL DE DUNNIGAN	60
QUADRE CLÍNIC	60
BASES MOLECULARS	61
LIPODISTRÒFIA FAMILIAR PARCIAL ASSOCIADA PPAR γ	62
QUADRE CLÍNIC	62
BASES MOLECULARS	62
LIPODISTRÒFIA ASSOCIADA A LA	
DISPLÀSIA MANDIBULOACRAL	62
QUADRE CLÍNIC	62
BASES MOLECULARS	63
ALTRES AFECCIONS DE LA	
DISTRIBUCIÓ DEL TEIXIT ADIPÓS	63
LIPOMATOSI ASSOCIADA A HALS	63
QUADRE CLÍNIC	63
BASES PATOGÈNIQUES	63
LIPOMATOSI ASSOCIADA A MERRF	64

Objectius	65
OBJECTIU CENTRAL	67
OBJECTIUS PARTICULARS	68
Resultats	69
1. <i>La infecció de l'HIV-1 altera l'expressió gènica del teixit adipós i contribueix a la lipodistròfia associada a HIV-1/HAART</i>	71
2. <i>Alteració de l'expressió gènica dels transportadors de nucleòsids (SLC28 i SLC29) en el teixit adipós de pacients infectats per l'HIV-1</i>	85
3. <i>Una aproximació transcriptòmica a la lipodistròfia associada a HIV en el teixit adipós indica que alteracions seqüencials en l'expressió de gens implicats en la inflamació i metabolisme oxidatiu porten a l'aparició d'aquesta síndrome</i>	115
4. <i>L'anàlisi diferencial de l'expressió gènica indica que les "gepes de búfal" són una alteració particular del teixit adipós dins de la lipodistròfia associada a HAART</i>	137
5. <i>Alteració de l'expressió de gens reguladors de l'adipogènesi en lipomes de pacients portadors de mutacions puntuals en el gen de la tRNA^{Lys} del DNA mitocondrial</i>	165
6. <i>L'anàlisi de l'expressió gènica mostra alteracions de la mitocondriogènesi i l'adipogènesi al teixit adipós d'un pacient amb lipodistròfia parcial adquirida (síndrome Barraquer-Simons)</i>	171

Anex de Resultats	185
<i>1. Efectes de TNFα sobre l'expressió gènica de cèl·lules adiposes en cultiu</i>	187
Resum Global	193
Conclusions	213
Bibliografia	217
Anex	255
<i>1. Citotoxicitat i toxicitat mitocondrial in vitro del Tenofovir per sí sol i en combinació d'altres antiretrovirals de cèl·lules renals del túbul proximal</i>	257
<i>2. Inhibició reversible de la síntesi de proteïnes mitocondrials durant la hiperlactatèmia associada a linezolid</i>	269

ÍNDIX DE FIGURES

FIGURA 1	7
FIGURA 2	8
FIGURA 3	9
FIGURA 4	10
FIGURA 5	13
FIGURA 6	15
FIGURA 7	16
FIGURA 8	16
FIGURA 9	17
FIGURA 10	18
FIGURA 11	20
FIGURA 12	21
FIGURA 13	29
FIGURA 14	37
FIGURA 15	42
FIGURA 16	185

ABREVIATURES

ABREVIATURES

3TC	Lamivudina
11βHSD1	<i>11β-hydroxysteroid dehydrogenase 1</i>
9cis RA	Àcid 9cis-retinoic
ABC	Abacavir
ACO	Acetil-Coa carboxilasa
ADD1/SREBP1	<i>Adipocyte Differentiation and Determination factor 1/Sterol Regulatory Element Binding Protein 1</i>
AGPAT	1-acilglicerol-3-fosfat-O-aciltransferasa
AMPc	AMP cíclic
ANT	Transportador de Nucleòtids d'Adenina
AP-1	Proteïna Activadora 1
ART	Teràpia antiretroviral
ATPasa	ATP sintetasa
AZT	Zidovudina
bZIP	<i>Basic leucine zipper</i>
C/EBP	Proteïna d'unió a CCAAT/ <i>enhancer</i>
CBP	<i>CREB Binding Protein</i>
CCR5	<i>Chemokine (C-C motif) Receptor 5</i>
CNT	<i>Concentrative Nucleoside Transporter</i>
CO	Citocromo Oxidasa
CPT-I	<i>Carnitine Palmitoyl-Transferase I</i>
CRABP-1	Proteïna citoplasmàtica de unió a àcid retinoic 1
CRBP	<i>Citoplasmatic retinol-binding protein</i>
CRE	Element de resposta a AMPc
CREB	Proteïna d'unió a CRE
CXCR4	<i>Chemokine (CXC motif) Receptor</i>
Cyp	Ciclofilina
Cytb	Citocromo b
d4T	Estavudina

ddC	Zalcitabina
ddI	Didanosina
DC	<i>Dendritic Cell</i>
DNA	Àcid Desoxiribonucleic
DNC	<i>Deoxynucleotide carrier</i>
DR	Repeticiones directas
EGF	Factor de creixement epidermal
ENT	<i>Equilibrative Nucleoside Transporter</i>
ESCRT	<i>Endosomal Sorting Complex Required for Transport</i>
ETS	<i>E26 Transformation-Specific</i>
FABP	Proteïna d'unió a àcids grassos
FAS	<i>Fatty Acid Synthase</i>
FIAP	<i>Fasting-induced adipose factor</i>
FIV	<i>Feline Immunodeficiency Virus</i>
GABP	<i>GA-binding protein</i>
GH	Hormona del Creixement
GLUT-4	Transportador de Glucosa de tipus 4
GR	Receptor de Glucocorticoids
GRE	Element de resposta a glucocorticoids
HAART	<i>Highly Active Antiretroviral Therapy</i>
HDL	Lipoproteïnes d'alta densitat
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
HSL	Lipasa Sensible a Hormones
IBMX	Isobutilmetilxantina
ICAM	<i>Intercellular Adhesion Molecule</i>
IFN	Interferó
IGF-1	Insulin-like Growth Factor 1
IGF-1R	Receptor d'IGF-1
IL	Interleuquina
IMC	Índex de massa corporal

IRS-1 y 2	Substrat del Receptor d'Insulina 1 i 2
LDL	Lipoproteïnes de baixa densitat
LEDGF	<i>Lens Epithelium-Derived Growth Factor</i>
LMNA	Làmina
L-PK	Piruvat quinasa de fetge
LPL	Lipoproteïna lipasa
LTR	<i>Long Terminal Repeats</i>
Lys	Lisina
MCSF	Factor estimulator de colònies de macròfags
MCP	<i>Monocyte Chemoattractant Protein</i>
MPTP	Porus de Permeabilitat de Transcisió Mitocondrial
mtDNA	DNA mitocondrial
NA	Noradrenalina
ND	NADH Deshidrogenasa
NEFAs	Àcids grassos no esterificats
NF	Nuclear Factor
NNRTI	<i>Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor</i>
NRF-1	<i>Nuclear Respiratory Factor-1</i>
NRTI	<i>Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor</i>
NT	<i>Nucleoside Transporter</i>
OXPHOS	Sistema cadena respiratòria/fosforilació oxidativa
p38MAPK	<i>p38 Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
PEPCK	Fosfoenol-Piruvat Carboxi Quinasa
PGC-1α	Coactivador del receptor activat per proliferadors peroxisomals γ -1 α
PGF$_{2\alpha}$	Prostaglandina F $_{2\alpha}$
PGI$_2$	Prostaciclina
PGJ$_2$	Prostaglandina J $_2$
PI3-K	Fosfatidilinositol 3-quinasa
PI	<i>Protease Inhibitor</i>
PIC	<i>Preintegrationn Complex</i>

PKA	Proteïna quinasa A
PPAR	<i>Peroxisomal Proliferator Activated Receptor</i>
PPRE	Element de resposta a PPARs
Pref-1	Factor preadipocitari 1
RA	Àcido retinoic
RALDH	Retinoaldehyd deshidrogenasa
RAR	Receptor de l'àcid retinoic
RARE	Element de resposta a RA
RBP	<i>Retinol-Binding Protein</i>
RELM	<i>Resistin-Like Molecule</i>
RNA	Àcid Ribonucleic
ROS	Espècies reactives d'oxigen
RT	Transcriptasa Reversa
RTI	<i>Retrotranscriptase Inhibitor</i>
RXR	Receptor X de retinoids
SCD1	<i>Stearoyl-Coa desaturase 1</i>
SIDA	Síndrome de la Immunodeficiència Adquirida
SIV	<i>Simian Immunodeficiency Virus</i>
T₃	Hormona tiroïdal
T₃RE	Element de resposta a T ₃
T₄	Tiroxina
TAB	Teixit Adipós Blanc
TAM	Teixit Adipós Marró
TFAM	<i>Mitochondrial Transcription Factor A</i>
TFBM	<i>Mitochondrial Transcription Factor B</i>
TG	Triacilglicèrids
TGF-β	<i>Transforming Growth Factor β</i>
TK	Timidina quinasa
TNF-α	<i>Tumour Necrosis Factor α</i>
TR	Receptor d'hormones Tiroïdals
TZDs	Tiazolidindiones
UCP	Proteïna desacoblant

VCAM	<i>Vascular Cell-Adhesion Molecule</i>
VDR	Receptor de la vitamina D
VLDL	Lipoproteïnes de molt baixa densitat
ZMPSTE	Metal·loproteïnasa
µg	Microgram
µl	Microlitre
ng	Nanogram

INTRODUCCIÓ

HIV-1: VIRUS DE LA IMMUNODEFICIÈNCIA HUMANA

Introducció

La pandèmia de l'HIV-1 és una complexa barreja de diverses epidèmies dintre i entre diferents regions i països del món, i sens dubte, és una de les majors crisis de salut pública del nostre temps. La recerca ha aprofundit el nostre coneixement sobre la replicació i progressió del virus dins del cos d'una persona infectada, però encara que dia a dia el coneixement de la dinàmica de transmissió i patogènesi són més acurats, i les opcions de prevenció s'han ampliat, la cura total o una vacuna efectives són inassequibles. No obstant, el tractament antiretroviral d'elevada activitat (HAART) ha

transformat radicalment el SIDA: d'una malaltia mortal ha passat a ser una malaltia crònica. Cal dir també que aquesta transformació és encara pura entelèquia en aquelles parts del món que continuen patint una càrrega desproporcionada de noves infeccions sense accés al tractament HAART, i per tant, estan més afectades per altes taxes de morbiditat i mortalitat.

Pandèmia

En el món, aproximadament, hi ha uns 38,6 milions de persones infectades pel virus de l'HIV-1, i uns 25 milions més ja han mort com a conseqüència d'aquesta infecció.¹ Avui

Figura 1. Distribució a nivell mundial de les infeccions per HIV-1, vies de transmissió, i subtipus de l'HIV-1. Tant les vies de transmissió com els subtipus de l'HIV-1 estan en l'ordre de major a menor freqüència.



en dia no hi ha cap regió del planeta on el virus no hi hagi arribat (figura 1).

La transmissió per via heterosexual és la més freqüent, amb un 85% de totes les infeccions per HIV-1. El sud de l'Àfrica és l'epicentre actual de la pandèmia i continua tenint altes taxes de noves infeccions per HIV-1.² Així mateix, encara que la prevalença total de l'HIV-1 romanguí baixa, a les epidèmies emergents de la Xina i l'Índia, els números absoluts són preocupants i comencen a assemblar-se als del sud de l'Àfrica. Fora de l'Àfrica subsahariana, un terç de totes les infeccions són adquirides per via parenteral associades a la drogodependència, de les quals, la majoria (8,8 milions) pertanyen al sud est i centre d'Àsia, i Europa de l'est.¹

Segons trets genètics diferencials de l'HIV, aquest virus es divideix principalment en dues grans famílies: l'HIV-1 i l'HIV-2 (figura 2). Al seu torn, l'HIV-1 es divideix en 3 grups (M, N i O), i l'HIV-2 en 8 (de l'A fins a l'H), dels quals, el grup majoritari és l'HIV-1 M. L'origen de tots aquests grups rau en l'evolució inicial del virus al llarg de tots els seus hosts primats (SIV, "Simian Immunodeficiency Virus") abans d'arribar a l'home. Així, l'HIV-1 ha evolucionat a partir de soques que van infectar el ximpanzé (*Pan troglodytes troglodytes*) SIVcpz,³ i l'HIV-2, de la soca del mangabei gris (*Cercoebus atys*) l'SIVsm.^{4, 5} A través d'aquesta transmissió entre espècies de primats a humans, les soques del virus s'han anat

seleccionant adquirint adaptacions que subseqüentment han facilitat la transmissió entre humans (figura 3).⁶ Per contra del què es podria pensar, l'entrada a l'hoste humà no ha suposat un final d'aquest procés sinó que, ans al contrari, la diversificació de formes és un fet patent. Només del subgrup M de l'HIV-1 s'han trobat 9 subtipus (figura 2), i diverses formes recombinants que contenen estructures genètiques de dos o més subtipus (p.ex., A/E=CRF01; A/G=CRF02).^{7, 8} No cal dir, que l'evolució continua de la diversitat de l'HIV-1 representa un gran obstacle per al desenvolupament de qualsevol prevenció o intervenció terapèutica.⁷

La coinfecció per dos o més soques del virus HIV és un dels mecanismes que podria portar a l'origen de noves soques recombinants. De fet, la recombinació entre ells sembla ser que es dona molt més

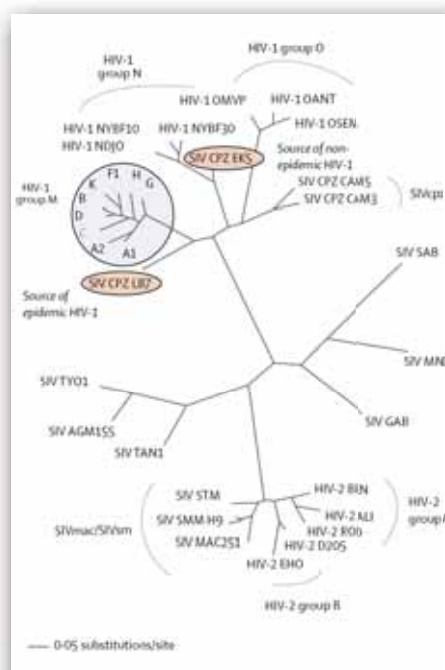


Figura 2. Relacions filogenètiques dels lentivirus humans i dels primats. La pandèmia de l'HIV-1 és causada principalment pel grup M de la soca de l'HIV-1, en concret, el subtipus C (en vermell). Hi ha formes recombinants que estarien emparentades amb dins del grup M i no han estat incloses per simplificar.

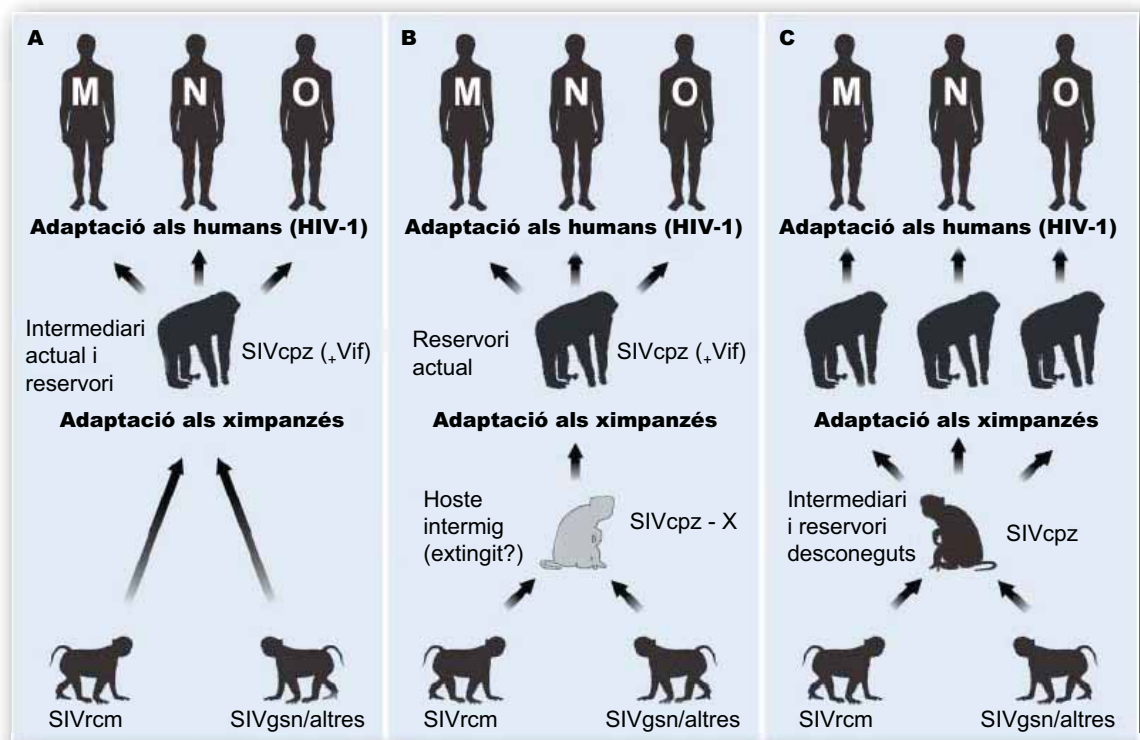


Figura 3. Possibles vies de transmissió creuada. (A) El ximpanzé com a hoste intermediari a través de la recombinació de 2 o més soques SIV dels micos en un mateix individu. (B) Un intermediari extingit origina una soca recombinant antecessora de l'SIVcpz, i el ximpanzé actua a mode de reservori. (C) Un intermediari desconegut origina una soca recombinant, i diversos ximpanzés actuen a mode de reservori. *Science* 313, 462 (2006), JH Heeney.

freqüentment del què es pensava,⁸ i les soques així originades, serien responsables de fins al 20% de les infeccions en algunes zones (p.ex. el sud-est asiàtic).⁹ Aquestes dades estarien d'acord amb que es donin coinfeccions de diferents soques en un context temporal espaiat que pot arribar a ser de mesos i anys.¹⁰⁻¹⁴ Aquestes observacions estarien en contradicció amb l'assumpte que només es realitza una sola adquisició d'una de les soques de l'HIV-1, i que aquesta donaria protecció vers altres possibles infeccions posteriors.¹⁵ De fet es creu que reinfeccions posteriors impliquen una progressió més ràpida del SIDA.¹¹

HIV

El virus de la immunodeficiència humana (HIV) és un retrovirus que pertany al gènere *Lentivirus* de la família *Retroviridae*. Les infeccions dels *Lentivirus* acostumen a mostrar un curs crònic de la malaltia que provoquen, un llarg període de latència clínica, una replicació viral persistent i una implicació del sistema nerviós central. Les infeccions del Visna a les ovelles, del virus de la immunodeficiència dels simis (SIV) a les mones, o el virus de la immunodeficiència dels felins (FIV) en els gats en són exemples típics.

A simple vista, a través del microscopi electrònic, l'HIV-1 i l'HIV-2 semblarien idèntics. No obstant, diferències importants comencen a aflorar quan comparem els pesos moleculars de les seves proteïnes i el seu genoma, en concret, els gens accessoris. Tots dos actuen a través de mecanismes patogènics comuns i es repliquen en els mateixos tipus cel·lulars, encara que l'HIV-2 genera una deficiència immune menys severa.

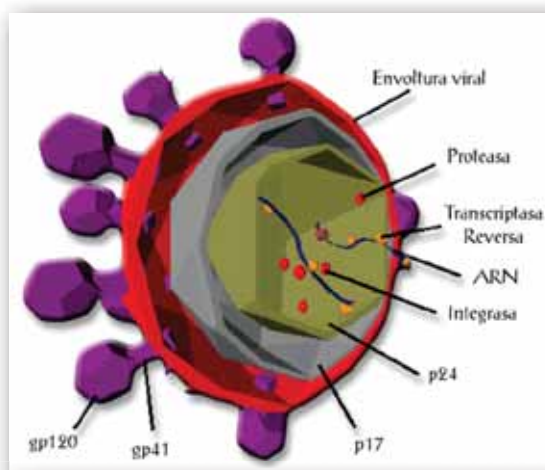


Figura 4.

Ultraestructura de l'HIV-1. Esquema dels diferents components que conformen l'HIV-1.

HIV-1:ULTRAESTRUCTURA

Els virions de l'HIV-1 tenen un diàmetre aproximat d'uns 100nm, i consten d'un embolcall lipoproteic. Aquesta bicapa lipídica és adquirida durant el procés de gemació en el que els nous virus es queden amb part de la membrana plasmàtica de l'hoste. Com a conseqüència, les proteïnes de la cèl·lula presents a la membrana, com les proteïnes HLA de classe I i de classe II, o proteïnes d'adhesió com ICAM-1, també estaran presents en el nou virió, i a més, li facilitaran l'entrada a altres cèl·lules diana. No obstant, en menor proporció, el virus també contribueix a la síntesi del seu embolcall amb proteïnes pròpies. Integrats a aquesta bicapa lipídica, cada partícula vírica conté 72 complexos glicoproteics, cadascun dels quals, es compon de trímers de la glicoproteïna externa gp120 i la proteïna transmembrana gp41 que els uneix a la membrana. La unió entre

gp120 i gp41 és feble de manera que gp120 pugui alliberar-se espontàniament quan sigui necessari: gp120 es troba en sèrum i al teixit limfàtic dels pacients infectats.

A la cara interna de la membrana trobem la proteïna p17, que conforma una matriu de simetria icosaèdrica (60 cares) tot estabilitzant la membrana. Al seu torn, aquesta matriu conté la càpside del virus, una estructura conoide que es compon de unes 2000 unitats de la proteïna p24 (figura 4).

El material genètic del virus és constituït per dues cadenes d'RNA que estan incloses dins de la càpside. L'RNA està estretament lligat a les proteïnes p7 i p6 (o p9) de la càpside, i a més, no es troba sol sinó que també hi ha altres proteïnes necessàries per a la replicació del virus: la transcriptasa reversa (p66/p55),^{16, 17} i diverses còpies de la integrasa (p32)¹⁸ i la proteasa (p11).

HIV-1: GENOMA

El genoma de l'HIV-1, quan es troba encapsidat dins de la forma vírica, consta de dues seqüències d'RNA dimeritzades quasi idèntiques.¹⁹ O per contra, pot estar integrat al DNA de l'hoste (provirus) en forma de doble cadena de DNA.

En aquest últim format, el total dels seus 9,8 kb (9.800 parells de nucleòtids) de DNA codifiquen per 9 gens, i ambdós extrems 5' i 3' de la seqüència genòmica del virus estan delimitats per seqüències repetitives (LTR, "*Long Terminal Repeats*"). Tres d'aquests gens codifiquen per a proteïnes estructurals comunes a tots els retrovirus (els gens Gag, Pol i Env), sent els sis restants, gens que codifiquen per a dues proteïnes reguladores (Tat i Rev) i quatre per a proteïnes accessòries (Vpu, Vpr, Vif i Nef).²⁰

El genoma de l'HIV-2 és una mica més llarg (10,3 kb) i li falta el gen Vpu, que és substituït per un altre d'equivalent anomenat Vpx.

Patogènesi

CICLE DE L'HIV-1

El cicle vital de l'HIV-1 és complex i la seva durada varia en funció de la cèl·lula diana i l'estat d'activació d'aquesta (figura 5). En els estadis inicials, el virus interacciona amb les cèl·lules hoste sense ocasionar danys, però durant la fase d'entrada

pot desencadenar cascades de senyals, que al seu torn, podrien facilitar la seva replicació.^{21, 22}

Unió. Sovint, una de les condicions més limitant d'una infecció retroviral és el número inicial de virions que arriben i s'uneixen a la superfície cel·lular. Les dues molècules que facilitaran el procés d'unió a la membrana són una glicoproteïna externa (gp120) i una proteïna transmembrana (gp41).²³

El primer pas durant el procés d'entrada és la unió de gp120 a la membrana cel·lular interaccionant amb el receptor de CD4. Aquesta unió comporta tota una sèrie canvis conformacionals que fan que les glicoproteïnes de l'embolcall víric donin lloc a l'exposició d'una regió de gp120, anteriorment amagada, que ara pot unir-se a un coreceptor de quimioquines.²⁴

Els receptors de quimioquines són proteïnes transmembrana acoblades a proteïnes G. La seva funció és captar quimioquines que dirigeixen la migració de les cèl·lules de la resposta immune. Aproximadament, existeixen una dotzena d'aquests coreceptors mitjançant l'entrada de l'HIV-1, i entre ells, CCR5 i CXCR4 són els més usats per l'HIV-1 en cèl·lules-T CD4⁺ i macròfags.^{23, 25}

En principi, la unió del virus a la cèl·lula podria ser inhibida. Les carragenines d'algues marines, lectines i la cianovirina interactuen amb la

glicoproteïna gp120 de la càpside vírica impedit així la replicació.²⁶⁻²⁸ Per altra banda, l'estudi del cristall de gp120 ha revelat detalls del lloc d'unió a CD4, entre ells, que hi ha una petita cavitat on es podrien acoblar agents inhibidors. No obstant, hi ha dubtes sobre la viabilitat clínica de la majoria d'inhibidors del virus a nivell de la unió i l'entrada a la cèl·lula relacionats amb la producció, la via d'administració i toxicitat. Els candidats més ben caracteritzats i més fàcilment sintetitzables podrien ser útils com a microbicides tòpics.²⁹

Fusió. En aquest pas es forma un porus a través del que serà possible l'entrada de la càpside viral a dins la cèl·lula. Aquest procés és dut a terme per gp41, que actua a mode d'àncora unint-se a la membrana de la cèl·lula hoste, i posteriorment aproximant-la a l'embolcall víric fins permetre la fusió entre elles.^{25, 30}

S'ha vist que la inhibició d'aquest pas és possible a partir de la síntesi de pèptids derivats de gp41. Actualment hi ha algun fàrmac d'aquest tipus que s'administra via subcutània.³¹ Altres possibilitats es centren en la unió de pèptids de talla petita que podrien unir-se a un domini de gp41.³²

Alliberament de la càpside. Per a què el material genètic del virió pugi ser retrotranscrit, la càpside i nucleocàpside del virus ha de ser desmantellada. Aquest procés no està clarament definit, però es creu que la

ciclofilina A (Cyp-A) interactuaria amb les proteïnes de la càpside desengalant-les.

Retrotranscripció. Quan el genoma víric ha estat alliberat al citoplasma cel·lular, és retrotranscrit. La transcriptasa reversa (RT) i altres proteïnes víriques formen un complex d'alt pes molecular que catalitza la conversió de les dues cadenes d'RNA a DNA de doble cadena (dsDNA).

En aquest punt és on actuen la majoria de fàrmacs d'ús actual en els tractaments HAART. Els anomenats inhibidors de la transcriptasa reversa (RTIs) hi juguen un paper molt important (veure en la secció 4).

Integració. Un cop retrotranscrit, el DNA víric necessita ser translocat al nucli, on s'integrarà al DNA de la cèl·lula hoste en regions riques en gens transcripcionalment actius. Amb aquesta finalitat, es formarà el complex de preintegració (PIC), que constarà de proteïnes víriques nucleofíliques, la integrasa vírica i enzims de reparació del DNA de l'hoste.³³⁻³⁵ Facilitant aquesta feina, també hi ha una integrasa de la cèl·lula hoste anomenada LEDGF/p75 ("*Lens Epithelium-Derived Growth Factor*"), l'acció de la qual, marca el punt d'inflexió on la transformació de la cèl·lula en una productora potencial de nous virions és irreversible.^{36, 37}

La integrasa vírica catalitza el tall de la seqüència LTR 3' del cDNA víric,³⁸ i mutacions que inhibeixen aquests talls donen lloc a virions sense

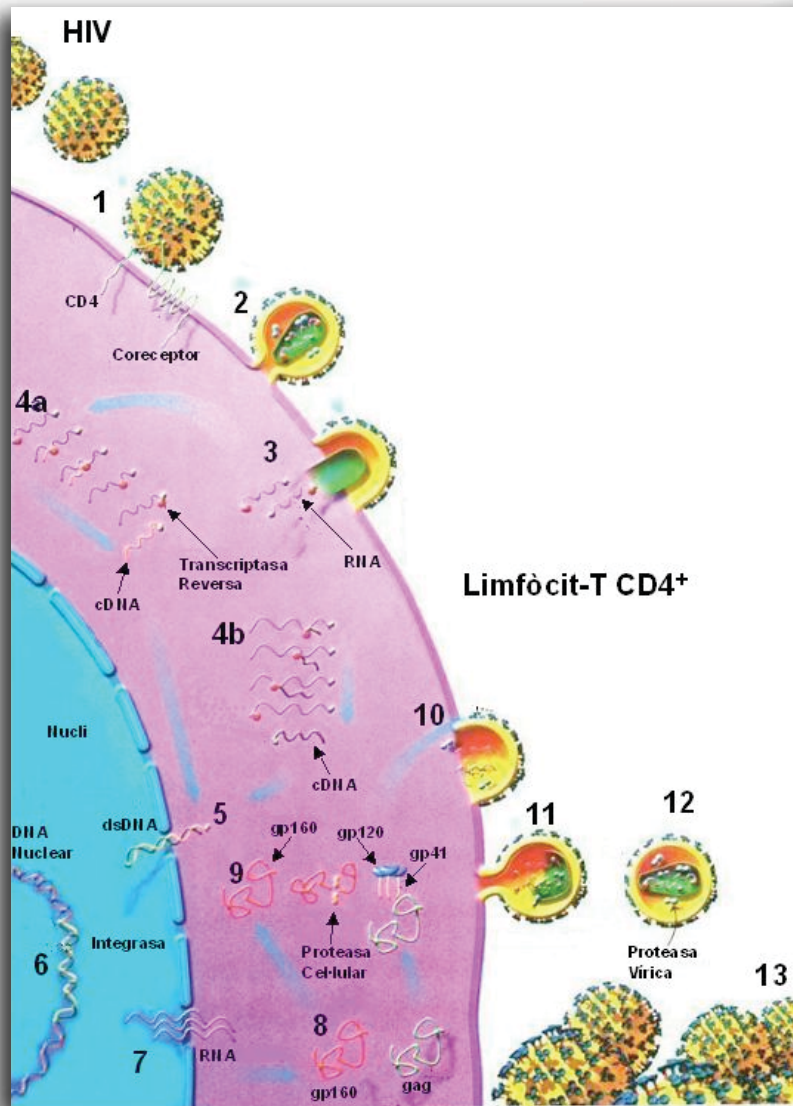


Figura 5.
Cicle de l'HIV-1:

1. Unió de gp120 a CD4 i el coreceptor.
2. Fusió de membranes.
3. Desngalament de la càpside.
4. (a) L'RT retrotranscriu l'RNA a cDNA de cadena senzilla. (b) Producció de la doble cadena de DNA (dsDNA) a partir dels motllos anteriors.
5. Importació de la dsDNA al nucli.
6. Integració al genoma de la cèl·lula hoste mitjançant l'acció de la integrasa.
7. Producció d'RNA víric a través de la maquinària de transcripció de la cèl·lula hoste.
8. Traducció de les proteïnes víriques.
9. Maduració proteica a través de proteases cel·lulars.
10. La proteïna gag actua com a aglutinant i senyal de transport cap a la membrana de totes les proteïnes víriques.
11. Formació i gemació dels nous virions.
12. Maduració dels virions a través de les proteases víriques.
13. Virus madurs.

capacitat d'infecció.³⁹ Tot i que les línies d'investigació de nous fàrmacs han intentat simular aquest efecte, els resultats són poc esperançadors de moment.

Síntesi vírica. La integració al genoma permet que es comenci la replicació del material genètic, i la transcripció i traducció de totes les proteïnes víriques necessàries per formar els nous virions. Aquesta transcripció és dirigida tant per components de la cèl·lula hoste com vírics.

Les proteases víriques són enzims encarregats de la maduració de proteïnes víriques necessàries per a la formació de nous virions. Una altra part de la component de la HAART actual es centra en els inhibidors d'aquestes proteases (veure la secció 4).

Encapsidació i extrusió. Totes les proteïnes i el nou dsRNA víric són transportats i engalats prop de la membrana plasmàtica. Un cop s'ha encapsidat el material genètic, de manera no lítica, es dona l'extrusió dels nous virus a través de la formació de d'endosomes (ESCRT-I,-II i -III),

que mitjançant un procés de gemació de cossos multivesiculars.^{40, 41} L'HIV-1 pot beneficiar-se d'aquesta via de sortida gràcies a la possibilitat d'unir-se a TSG101 a través del domini p6 de Gag.⁴²

SIDA

Durant els estadis inicials de la síndrome de la immunodeficiència adquirida (SIDA), després que l'HIV-1 hagi traspasat qualsevol de les barreres físiques de l'organisme (mucoses), hi ha un parèntesi temporal en el que la propagació de la infecció no ha acabat d'establir-se, i en el que les defenses de l'organisme podrien controlar l'expansió vírica.⁴³ En general, les cèl·lules dendrítiques (DC) són presents en les mucoses oral i vaginal, i se suposa que estan entre els primers tipus cel·lulars que entren en contacte amb l'HIV-1. S'ha proposat que les DCs són les que posteriorment estenen l'HIV-1 entre els limfòcits-T CD4⁺ i macròfags,⁴³ i com a conseqüència d'això s'originaria la primera amplificació del virus, sobretot, a nivell del sistema limfàtic. Les vies potencials de transmissió poden ser la formació de sinapsis víriques entre DCs i cèl·lules-T,^{44, 45} infecció en *trans* a través d'exosomes provinents de les DCs,⁴⁶ i infecció de DCs en *cis* per unió directa del virus a receptors de mannanosa.^{47, 48} Amb la migració dels virions o dels limfòcits-T infectats al corrent sanguini, comença una segona fase d'amplificació a nivell

del tracte gastrointestinal, melsa i moll de l'os que resulta en una infecció massiva de totes aquelles cèl·lules que en siguin susceptibles. En relació al pic del títol víric (unes 10⁶–10⁷ còpies/mL de plasma) i el descens de limfòcits-T CD4⁺ d'aquest primer estadi de la infecció, poden manifestar-se els primers símptomes clínics (figura 6). La producció d'anticossos vers l'HIV-1 marca el final de la fase aguda de la infecció.

El segon període de la infecció, la fase de latència (o crònica), es caracteritza per l'absència de qualsevol tipus de simptomatologia. A diferència de la fase aguda, els nivells de virèmia són uns dos ordres de magnitud més baixos, tot i que la seva replicació és constant. Aquesta reducció s'atribueix principalment a la resposta específica dels limfòcits-T CD8⁺ citotòxics contra l'HIV-1, però també podria ser-ne causa la disminució de cèl·lules diana (figura 4). Per altra banda, es produeix una depleció progressiva de les cèl·lules-T CD4⁺ (naives i amb memòria) fins a nivells ínfims, que conseqüentment, resultarien en l'inici de la SIDA pròpiament dita.⁴⁹ Malgrat la freqüent absència de símptomes durant la fase crònica, la replicació de l'HIV-1 és constant i dinàmica durant tota l'evolució de la malaltia. El temps de vida mitja d'un sol virió és més baix de 30 minuts, i el número total de virions produïts en una persona pot arribar a ser d'unes 10¹⁰ partícules víriques per dia.^{42, 50} Així mateix, hi ha

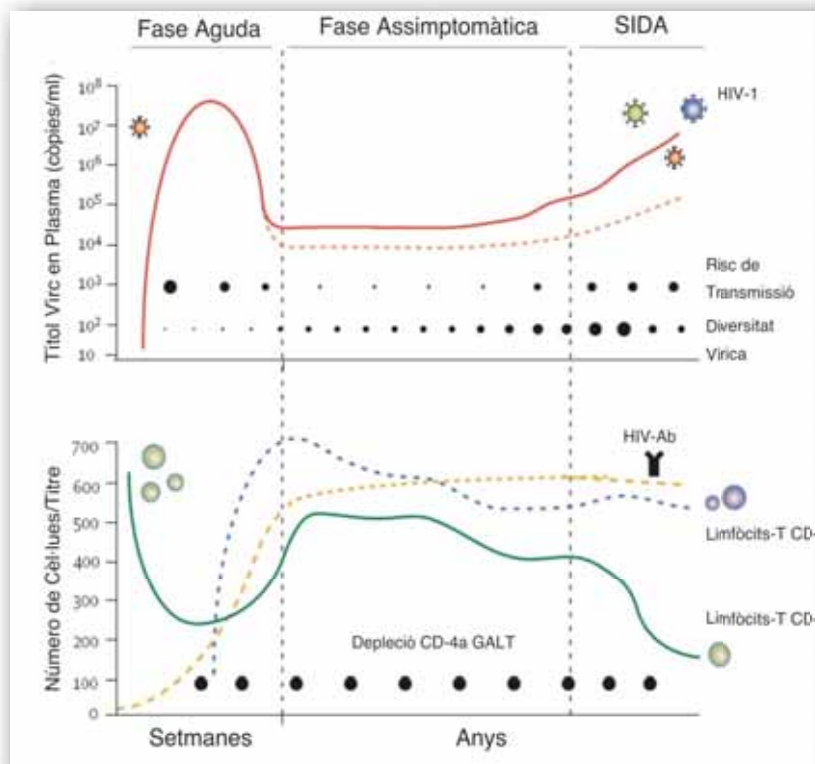


Figura 6. Curs de la infecció per HIV-1. El títol víric en plasma (a dalt), i els canvis dinàmics dels limfòcits-T CD4+ (a baix). El primer estadi de la infecció es caracteritza per una elevada virèmia (línia vermella), cèl·lules CD4 baixes (línia verda), i absència d'anticossos específics contra l'HIV-1 (línia taronja). La virèmia decau amb l'augment de limfòcits-T CD8+ citotòxics (línia blava) i la càrrega viral s'estabilitza durant la fase crònica de la infecció. Aquesta càrrega viral és molt variable entre individus (línia vermella puntejada). La diversitat vírica incrementa amb la progressió de la malaltia. Per contra, el risc de transmissió és màxim durant les primeres setmanes. GALT= gut-associated lymphoid tissues.

una inducció de les taxes de recanvi de la població de limfòcits durant la infecció, mentre que la proliferació cel·lular disminueix quan baixa la replicació viral a causa del tractament HAART. S'han proposat diferents mecanismes per explicar aquesta depleció, però la més acceptada apunta a un augment generalitzat del nivell d'activació del sistema immune.

51

Un altre tret de la fase de latència és la variabilitat de la seva durada dependent de cada individu. Així com la fase aguda es compta per setmanes, la crònica pot arribar a durar de 8 a 10 anys. És evident que la resistència a la infecció del virus del SIDA és molt rara posat que l'àmplia majoria de pacients acaba desenvolupant la SIDA, no gens menys, hi ha dos grups de pacients que mostren immunitat o alta

resistència a la infecció de l'HIV-1. S'anomenen “*long term non progressors*” i “*highly exposed persistently seronegative*”, respectivament. Lògicament, els mecanismes d'immunitat innata i adquirida d'aquests individus estan sent estudiats, i segurament, trobar els elements diferencials inherents en els seu sistema immune contribuirà al desenvolupament de la vacuna contra l'HIV-1.⁵²

HAART: TERÀPIA ANTIRETROVIRAL

Introducció

L'administració d'un potent combinat de fàrmacs antiretrovirals contra la infecció del virus HIV-1, conegut com a HAART (Highly Active Antiretroviral Therapy), aconsegueix una ràpida reducció dels nivells d'RNA virals en plasma i en cèl·lules infectades en el teixit limfàtic. Aquesta disminució s'atribueix a la mort de cèl·lules CD4⁺ infectades i a la prevenció de noves infeccions.⁵³ Uns nivells d'RNA viral per sobre de les 50 còpies per mil·lilitre de plasma (límit de les actuals tècniques de detecció), indicarien una supressió inadequada i un risc d'infecció per part de virus resistents.⁵⁴

Les conseqüències immunològiques de la supressió de la replicació del virus són molt importants, donant lloc a un increment en el número de limfòcits CD4⁺. La capacitat de respondre a

antígens, tant de les cèl·lules CD4⁺ com de les CD8⁺, és regenerada i consegüentment, les infeccions oportunistes persistents es reverteixen en la majoria dels casos.^{55, 56}

Fàrmacs Antiretrovirals

L'HIV necessita retrotranscriure el seu RNA de cadena simple a DNA de doble cadena per poder integrar el seu material genètic al genoma de la cèl·lula hoste, i així, acabar posant al seu servei tota la maquinària transcripcional i traduccional d'aquesta per a la producció de noves partícules infeccioses. Els fàrmacs antiretrovirals usats actualment s'agrupen dins de tres grans famílies, cadascuna de les quals intervé de manera diferent en tot aquest procés. L'administració combinada d'aquests fàrmacs resulta en una acció de

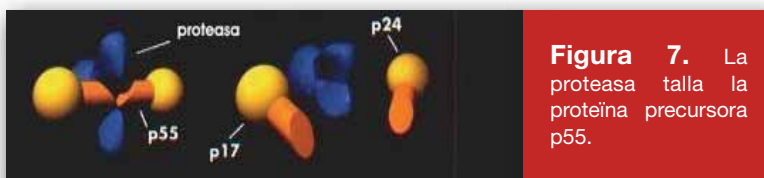


Figura 7. La proteasa talla la proteïna precursora p55.

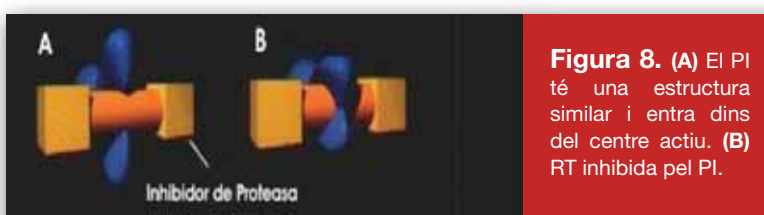


Figura 8. (A) El PI té una estructura similar i entra dins del centre actiu. (B) RT inhibida pel PI.

bloqueig coordinada, tant de la replicació com de la maduració del virus, aconseguint així un millor control de la càrrega viral i del desenvolupament de la SIDA.

INHIBIDORS DE PROTEASES (PIs)

Els PIs són molècules dissenyades com a substrats anàlegs de les proteases víriques que bloquegen el centre actiu de la proteasa un cop s'hi uneixen. Això evitarà la formació de nous virions donat que la funció d'aquestes proteases és la de tallar les proteïnes precursors que donaran lloc a les proteïnes madures i funcionals necessàries (Figura 7 i 8).

Els PIs que s'utilitzen a la teràpia antiretroviral són: amprenavir, indinavir, lopinavir, nelfinavir, ritonavir i saquinavir.

INHIBIDORS DE LA TRANSCRIPTASA REVERSA (RTIs)

TRANSCRIPTASA REVERSA DE L'HIV-1

La retrotranscriptasa (RT) de l'HIV-1 és un heterodímer (p66/p51) amb llocs d'unió a l'RNA i DNA dependent de l'activitat DNA polimerasa. Consta de dues activitats catalítiques: per una banda realitza la retrotranscripció de l'RNA genòmic viral a DNA de doble cadena, i per una altra, consta d'activitat RNasaH.

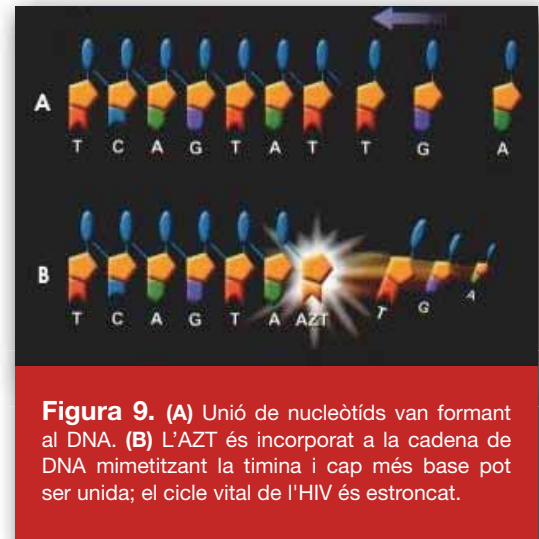


Figura 9. (A) Unió de nucleòtids van formant al DNA. (B) L'AZT és incorporat a la cadena de DNA mimetitzant la timina i cap més base pot ser unida; el cicle vital de l'HIV és estroncat.

Ambdues activitats són dutes a terme per la subunitat p66, la p51 juga una funció estructural.^{16, 17}

NRTIs: INHIBIDORS DE LA RT ANÀLEGS DE NUCLEÒSIDS

Els NRTIs són compostos derivats d'adenosina, citosina, i timina. Són inhibidors competitiu i actuen com a substrat alternatiu per al procés de polimerització del DNA. Són considerats profàrmacs ja que necessiten ser metabolitzats per ser actius, concretament, un cop dins de la cèl·lula, han de ser fosforilats per generar la forma 5'-trifosfat. La modificació química més important d'aquests compostos és que els manca l'extrem 3'-OH, o en el cas de la zidovudina, que aquest extrem ha estat substituït per un grup azida (N_3). Aquesta modificació evita la formació de l'enllaç 3'-5' fosfodiéster entre els nucleòsids de la cadena de DNA en elongació i el nucleòsid 5' trifosfat entrant. D'aquesta manera, els NRTIs actuen com a terminadors de

la funció de la transcriptasa reversa del virus (Figura 9).

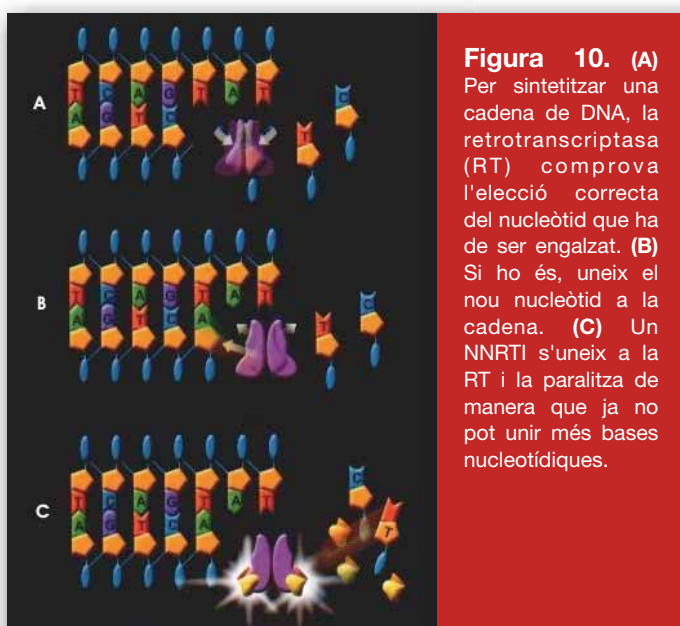
Actualment, els NRTIs d'ús més freqüent són: estavudina (d4T), didanosina (ddI), lamivudina (3TC), zidovudina (AZT), zalcitabina (ddC) i abacavir (ABC).

NNRTIs: INHIBIDORS DE LA RT NO ANÀLEGS DE NUCLEÒSIDS

Els NNRTIs inclouen un grup de compostos policíclics de naturalesa química divergent que actuen com a inhibidors al·lostèrics no competitius de la RT: s'uneixen covalentment a una cavitat hidrofòbica adjacent al domini actiu polimerasa de la subunitat p66 anomenat NNRTI-BP,⁵⁷ induint modificacions estructurals que disminueixen la taxa d'incorporació de nucleòtids⁵⁷ a través del desplaçament de residus aspartat del domini catalític polimerasa.⁵⁸ A diferència dels

NRTIs no necessiten ser metabolitzats per ser actius (figura 10).

Aquest grup de fàrmacs inclou: efavirenz, delavirdina i nevirapina.



TRANSPORTADORS DE NUCLEÒSIDS

Introducció

Els nucleòsids i nucleòtids desenvolupen diferents funcions dins de la fisiologia cel·lular, i són considerats tant nutrients com moduladors de l'homeòstasi cel·lular. A part de la seva funció com a precursors dels àcids nucleics, són elements clau del metabolisme energètic, lligands de receptors purinèrgics i transductors de senyals endocrines. Queda clar doncs, que modulen un ampli ventall d'esdeveniments cel·lulars.

Les rutes biosintètiques dels nucleòtids només són actives en determinats tipus cel·lulars i són energèticament molt costoses. Així, les seves rutes de salvament i reciclatge són vies d'ús freqüent, essent els hepatòcits i tipus cel·lulars similars, on es porta a terme una síntesi endògena de nucleòtids més alta.

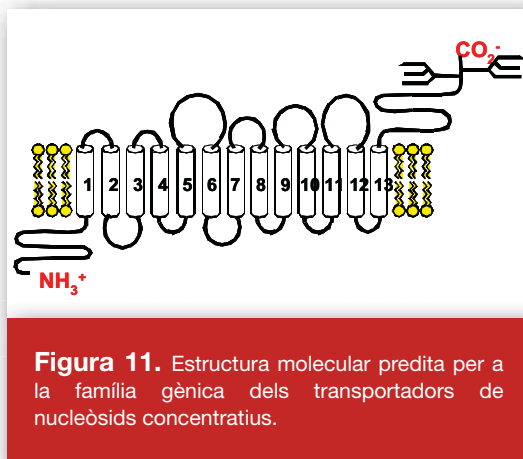
No obstant, el primer coll d'ampolla que qualsevol molècula extracel·lular ha de passar és la membrana plasmàtica, que és de naturalesa hidrofòbica. Els nucleòsids són molècules hidrofíliques i, per tant, la permeabilitat de la membrana vers aquests compostos és baixa o gairebé negligible. Per facilitar un pas eficient

d'aquests substrats, hi ha unes proteïnes de membrana que catalitzen aquesta translocació des del medi extracel·lular cap al citoplasma: els transportadors de nucleòsids (NTs).

Precisament, l'ús de tota una sèrie de fàrmacs anomenats derivats de nucleòsids està dirigit a determinats processos (síntesi del DNA, l'RNA, i senyalització) dependents de la incorporació de nucleòsids extracel·lulars. En principi, aquesta dependència de l'abastament de nucleòsids d'origen extracel·lular en cèl·lules, altament proliferants o en les que s'estan replicant virus a gran escala, constituiria una diana relativament específica per a l'efecte d'aquests anàlegs de nucleòsids. Conseqüentment, aquests derivats de nucleòsids també interferirien en la captació normal de nucleòsids mitjançant competició simple.

Mecanismes de Transport

Els primers indicis en favor del transport de nucleòsids per mitjà de proteïnes de membrana van



aparèixer fa unes quantes dècades. Mitjançant aproximacions bioquímiques, es va assajar la quantitat de substrat que fluïa a través de la membrana plasmàtica i s'acumulava dins les cèl·lules. La cinètica d'aquests fluxos va ser suficientment heterogènia com per reflexar l'acció de diferents transportadors, la identificació dels quals va trigar bastant més.^{59, 60}

En les cèl·lules existeixen bàsicament dos tipus de transport de nucleòsids: un mecanisme de transport concentratiu, i per contra, un altre equilibratiu.

TRANSPORTADORS DE NUCLEÒSIDS CONCENTRATIUS (CNTs)

La família de gens SLC28 (Solute Carrier 28) és la que codifica pels CNTs. Els dos primers cDNAs aïllats dels NTs van ser CNT1 i CNT2 de rata (rCNT1 i rCNT2).^{61, 62} Més tard es van clonar i caracteritzar els seus hortòlegs humans hCNT1, hCNT2 i hCNT3.⁶³⁻⁶⁵ Els tres subtipus de transportadors humans

consten de 13 dominis transmembrana i, deduïda dels seus cDNAs, tenen una talla de 649, 658 i 698 residus aminoacídics, respectivament (figura 11). Tot i la falta d'anticossos prou específics per algunes isoformes humanes dels CNTs i la creença inicial que aquests només es trobarien a alguns epitelis, la combinació amb estudis dels seus hortòlegs murins han aportat indicis que l'expressió dels CNTs és bastant ubíqua: intestí, ronyó, fetge, pàncrees, cor, pulmó, teixit adipós marró, limfòcits B, i macròfags.^{63, 66-68}

Els CNTs desenvolupen un mecanisme de transport contra gradient (concentratiu), depenent de , i d'alta afinitat i especificitat. Aquest sistema doncs, dóna lloc a un flux d'entrada unidireccional i irreversible de nucleòsids.

Tots ells reconeixen la uridina com a substrat amb afinitats que varien entre 20 i 80 μM , i cadascun d'ells és específic per a una activitat transportadora de nucleòsids diferent. hCNT1 mostra una activitat de transport preferencial per a les pirimidines,^{63, 69} hCNT2 per les purines,^{65, 70, 71} i hCNT3, d'ambdues classes. Per a hCNT1, l'adenosina també podria actuar com a inhibidor.^{72, 73}

TRANSPORTADORS DE NUCLEÒSIDS EQUILIBRATIUS (ENTs)

La família de gens SLC29 codifica pels ENTs: hENT1 i hENT2.⁷⁴⁻⁷⁶ Recentment s'han clonat hENT3 i hENT4,⁷⁷ tot i que no estan completament caracteritzats. hENT1 i hENT2 es componen d'uns 450 i 452 aminoàcids, respectivament, que s'estructuren en 11 dominis transmembrana (figura 12). La seva expressió a nivell de teixits és ubiqua, amb variabilitat d'abundància relativa en cada teixit.⁶⁰

Els ENTs porten a terme un transport de difusió simple (equilibratiu), a favor de gradient, de baixa afinitat i poca especificitat. Encara que aquest tipus de transport és reversible, els ENTs poden contribuir considerablement a establir un flux d'entrada unidireccional. Això passa quan aquest transport està estretament acoblat a una metabolització dels nucleòsids o els seus anàlegs transportats (p.ex., la fosforilació d'aquests per convertir-se en els nucleòtids corresponents, i la seva retenció).

Tant hENT1 com hENT2 tenen afinitats similars pels diferents nucleòsids (purines i pirimidines), a diferència de la citidina, que és transportada amb major afinitat per ENT2 (10 vegades més).⁷⁸

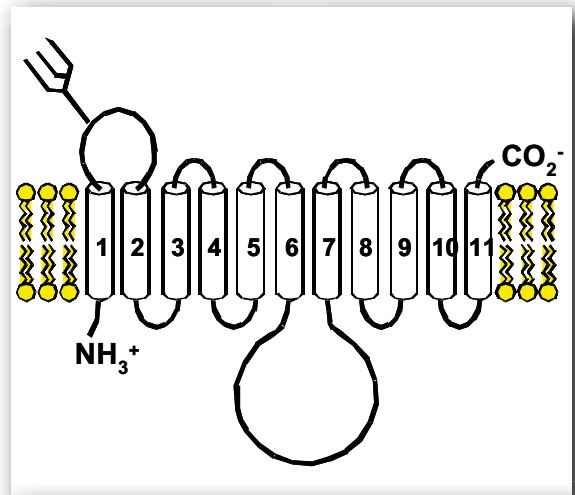


Figura 12. Estructura molecular predita per a la família gènica dels transportadors de nucleòsids equilibratius.

Regulació

A priori, l'expressió de qualsevol proteïna podria ser constitutiva o regulada. De fet, que els NTs mostrin diferents tipus de regulació indicaria l'existència de rols fisiològics complementaris, cosa que explicaria la necessitat que els NTs es coexpressin i tinguin especificitats i afinitats diferents. Per altra banda, des d'una perspectiva clínica, la regulació de l'activitat de transport dependent d'isoforma, oferiria l'oportunitat de modular la biodisponibilitat de fàrmacs i millorar els tractaments aplicats a les teràpies antivirals i antitumorals.

No obstant, encara que la regulació de l'activitat i l'expressió dels NTs és poc coneguda i només ha estat estudiada en determinats tipus cel·lulars, se sap que l'expressió dels

NTs no és constitutiva. Fins i tot en el cas de l'NT més ubicu i més abundant com és ENT1, l'expressió sembla estar regulada a nivell transcripcional i postranscripcional sent altament induït en processos de proliferació en macròfags i tumors.^{67, 68, 79}

En el cas dels CNTs l'expressió és altament dependent del grau de diferenciació cel·lular.⁸⁰⁻⁸³ A més, CNT1 és sensible a diferents tipus de citocines i a la depleció dels acúmul·ls de nucleòtids endògens per la inhibició farmacològica de la ribonucleòtid reductasa.⁸⁴ CNT2 és activat transcripcionalment per factors proapoptòtics i estaria implicat en la regulació de respostes purinèrgiques.⁸⁵

En qualsevol cas, un dels principals problemes a l'hora d'estudiar els NTs és la dificultat per trobar models cel·lulars on estudiar les seves propietats biològiques, particularment per CNT1, una isoforma amb una distribució molt més minsa que la d'altres transportadors i una activitat que molt sovint s'acaba perdent en cultius cel·lulars, fins i tot en aquells tipus cel·lulars on el seu mRNA és fàcilment detectable.

TEIXIT ADIPÓS

Introducció

La principal activitat de tot ésser viu és assegurar-se una font d'energia per realitzar totes aquelles activitats que el mantinguin viu. En el cas dels animals, l'alimentació facilita l'entrada de nutrients a partir dels quals extraure'n l'energia metabòlica necessària. No obstant, l'amenaça constant de la falta d'aliments fa que l'emmagatzemament d'energia sigui essencial per suplir un flux continuat d'aquesta energia, i el teixit adipós és l'òrgan que realitza aquesta funció.

Per altra banda, el teixit adipós juga un paper crucial en la regulació i la disfunció patològica de l'homeòstasi energètica. En els mamífers, això representa un compromís entre l'aport i la despesa energètica que, en gran part, s'aconsegueix a través de la resposta coordinada del sistema nerviós i del teixit adipós. Situacions com la ingesta, la gestació, la necessitat de produir calor i l'exercici físic són processos que determinaran el balanç energètic final i que, en última instància, afectaran el pes corporal. La producció o mobilització de les reserves lipídiques es portarà a terme en funció de l'excedent calòric procedent de la dieta o de la deficiència energètica, com en situacions de dejú, respectivament.

En quant al metabolisme de la glucosa, aquesta també és captada selectivament pel teixit adipós depenent de l'acció de la insulina alliberada per les cèl·lules β del pàncrees, i també, dels àcids grassos i glicerol alliberats pel teixit adipós, que acabaran influint en el metabolisme hepàtic i perifèric de la glucosa.

En humans s'ha demostrat àmpliament que la diferenciació de la cèl·lula adiposa (l'adipòcit, que constitueix els teixits adiposos) i l'acumulació de greix que aquesta porta a terme (hipertròfia) són processos fortament relacionats amb l'aparició i desenvolupament de l'obesitat; una patologia resultant del desequilibri entre la incorporació d'energia i la seva utilització, resultant en un balanç positiu i en un guany de pes. L'obesitat implica un risc per la salut donat que porta associades tot un conjunt d'anomalies metabòliques que es coneixen com a síndrome metabòlica: diabetis de tipus II, dislipidèmia i malalties cardiovasculars.

Una altra situació patològica molt menys freqüent en humans, és la lipoatròfia, de la que se'n parla extensament més tard.

En mamífers, existeixen dos tipus de teixits adiposos: el teixit adipós blanc (TAB) i el teixit adipós marró (TAM). Ambdós tenen

capacitat de metabolitzar i emmagatzemar lípids, tot i que les seves funcions són ben diferents. El teixit adipós blanc és l'òrgan específic que emmagatzema l'energia sobrant en forma de greix neutre després d'una ingesta i, quan és necessari, és capaç de proveir energia en forma d'àcids grassos i glicerol. El teixit adipós marró, per altra banda, té una funció fisiològicament oposada: permetre la dissipació d'energia en forma de calor en comptes de l'emmagatzemament d'aquesta.

TAB: Teixit Adipós Blanc

El teixit adipós blanc, que és el teixit adipós majoritari en humans, està extensament distribuït per tot el cos en grans quantitats i en dipòsits concrets (visceral i subcutani). A part dels adipòcits, el TAB també conté diferents tipus cel·lulars, com els preadipòcits sense diferenciar, fibroblasts, cèl·lules endotelials dels vasos sanguinis, cèl·lules del sistema immune i cèl·lules nervioses.

Com ja s'ha dit, la seva funció sobre l'homeòstasi lipídica consisteix en emmagatzemar l'energia sobrant en forma de triacilglicèrids i alliberar àcids grassos lliures i glicerol quan la despesa energètica sobrepassa la ingesta d'energia, sota el control del sistema nerviós i endocrí.

EL TEIXIT ADIPÓS COM A ÒRGAN ENDOCRÍ

Tradicionalment, el teixit adipós blanc s'ha considerat com un reservori passiu d'energia. Actualment però, està plenament establert que el TAB, mitjançant la secreció de factors endocrins i paracrins, juga un paper molt més actiu en la regulació del metabolisme i l'homeòstasi corporal.⁸⁶

Ja al 1987 es va identificar el teixit adipós com el lloc de major metabolització d'hormones esteroidals⁸⁷ i de producció d'adipsina, un factor endocrí que està marcadament disminuït en rosegadors i obesos.⁸⁸ La subseqüent identificació i caracterització de la leptina va establir de manera definitiva la idea que el teixit adipós blanc és un òrgan endocrí.⁵⁴ Actualment, se sap que el teixit adipós és capaç d'expressar i secretar una gran varietat de pèptids bioactius, coneguts com adipoquines, que actuen de manera local (funció autocrina/paracrina) i sistèmica (endocrina).

LEPTINA. La identificació de la leptina com a hormona adipostàtica,⁸⁹ va transformar la visió del teixit adipós i de l'obesitat. La leptina és una hormona polipeptídica produïda en un 95% pel teixit adipós (especialment de dipòsits subcutanis) i els seus nivells circulants correlacionen positivament amb

l'índex de massa corporal.⁹⁰ A més, el menjar, la composició d'aquest, la temperatura ambiental, l'exercici, el patró de la son i el balanç energètic són factors que regulen les concentracions de leptina en plasma.⁹¹⁻⁹⁴ Aquestes influències semblen estar mitjançades principalment per la insulina, l'entrada de glucosa als adipòcits i els reguladors del sistema nerviós simpàtic.^{91, 92} La regulació de la secreció de leptina per aquests factors, que reflexen l'estat energètic de l'organisme, suggereix que el teixit adipós és capaç de detectar a curt i llarg termini canvis de les necessitats energètiques corporals i modular la seva activitat endocrina en conseqüència. L'administració de vitamina A també s'ha vist que disminueix l'expressió de leptina al teixit adipós independentment de canvis en la massa adiposa.⁹⁵ La funció més important de la leptina és, a través del sistema nerviós central, inhibir la ingesta, alterar el pes corporal, la despesa energètica i la funció neuroendocrina, així com també, a nivell perifèric, afectar al múscul esquelètic, fetge, pàncrees, teixit adipós i altres tipus cel·lulars.⁹⁶

INTERLEUQUINA-6 (IL-6). La IL-6, que estructuralment està relacionada amb la leptina, actua com a hormona. El teixit adipós produeix quantitats substancials d'IL-6 i aquesta secreció pot arribar a representar entre el 10 i el 30% dels

nivells circulants en plasma.⁹⁷ Els nivells d'expressió de la IL-6 al teixit adipós i la concentració d'IL-6 en plasma correlacionen positivament amb fenòmens d'obesitat, tolerància alterada a la glucosa i resistència a la insulina.⁹⁸ Tant els nivells de expressió com de concentració en plasma disminueixen en situacions de pèrdua de pes. A més, els nivells d'IL-6 al plasma són un bon indicador del possible desenvolupament de diabetis mellitus de tipus II i enfermetats cardiovasculars.

TNF α . TNF α (factor de necrosi tumoral α) és una proteïna transmembrana que pateix processos proteolítics donant lloc a la forma biològicament activa que exerceix la seva funció a través de receptors de tipus I i II. TNF α s'expressa i sintetitza, entre altres teixits, al teixit adipós, pels adipòcits i cèl·lules de l'estroma vascular.⁹⁴ Els adipòcits també expressen ambdós tipus de receptors de TNF α .⁹⁹ Encara que inicialment TNF α es va relacionar amb processos de caquèxia, actualment se sap que està implicat en la patogènesi de la obesitat i la resistència a la insulina.^{99, 100} Els nivells de TNF α estan augmentats en situacions d'obesitat en humans i rosegadors i correlacionen positivament amb adipositat i resistència a la insulina.¹⁰⁰

S'han descrit diferents possibles mecanismes d'acció de TNF α . Al

teixit adipós, TNF α reprimeix gens involucrats amb la captació i emmagatzemament d'àcids grassos no esterificats (NEFAs o non-esterified fatty acids) i glucosa, inhibeix gens de factors de transcripció associats a processos d'adipogènesi i lipogènesi i indueix canvis a l'expressió de diferents factors secretats per l'adipòcit, com l'adiponectina i la IL-6. Al fetge, TNF α actua reduint l'expressió de gens implicats a la captació de glucosa i el metabolisme i oxidació d'àcids grassos i indueix l'expressió de gens involucrats en la síntesi *de novo* de colesterol i àcids grassos.¹⁰¹ Addicionalment, TNF α afecta la senyalització de la insulina, mitjançant l'activació de serina quinases que fosforilen els substrats del receptor d'insulina 1 i 2,¹⁰² transformant-els en substrats pobres per a les quinases del receptor d'insulina i accelerant la seva degradació.^{100, 103} TNF α a més, altera els processos de senyalització de la insulina, indirectament mitjançant l'increment dels nivells de NEFAs al plasma.

Un altre efecte de TNF α sobre els adipòcits és la inducció de l'apoptosi¹⁰⁴ i el bloqueig de la diferenciació adipocitària^{105, 106} suggerint un altre mecanisme pel que aquesta citoquina està limitant un excés d'adipositat.

ADIPONECTINA.
L'adiponectina és una hormona

peptídica que s'expressa de manera abundant i específica al teixit adipós i circula en grans quantitats pel torrent sanguini, en forma de diferents isoformes proteiques.^{107, 108} S'han descrit dos receptors d'adiponectina, AdipoR1 i R2,¹⁰⁸ que s'expressen principalment al múscul i al fetge, respectivament. La funció que exercirà aquesta adipoquina dependrà no només de la seva concentració al plasma i de les seves propietats sinó també de l'expressió teixit-específica dels receptors AdipoR1 i R2.

S'ha establert una potent correlació inversa entre l'adiponectina i la resistència a la insulina i estats d'inflamació. Les concentracions d'adiponectina es veuen encara més disminuïdes en situacions de diabetis mellitus i resistència a la insulina. A més, l'administració d'adiponectina recombinant reverteix la resistència a la insulina, en part per l'augment de l'oxidació d'àcids grassos i de la dissipació d'energia per part del múscul esquelètic i en part per la inhibició de la captació de glucosa per part del fetge. L'adiponectina és única entre les hormones ja que actua facilitant l'acció d'una altra hormona, la insulina.

ÀCIDS GRASSOS. Els àcids grassos no esterificats (NEFA) provenen del TAB com a conseqüència de la lipòlisi. La major proporció dels NEFA circulants viatja

unida a albúmina, mentre que una part viatja de forma lliure. En teixits lipogènics com el fetge i el teixit adipós, els àcids grassos es poden sintetitzar *de novo* (lipogènesi) gràcies a la glucosa. Per tant, el fetge, el teixit adipós i el múscul seran les principals dianes de regulació gènica per als àcids grassos. A més de la seva funció com a molècules energètiques, els àcids grassos també actuen com a senyals implicades en la regulació de l'expressió gènica. Els àcids grassos estimulen la transcripció de gens que codifiquen per a proteïnes implicades al transport d'àcids grassos, com la proteïna d'unió a àcids grassos (FABP o "*Fatty Acid Binding Protein*") i proteïnes del metabolisme dels àcids grassos, com la LPL (lipoproteïna lipasa), la CPT-I ("*Carnitine Palmitoyl Transferase I*") i les proteïnes desacoblants 2 i 3, entre altres. Per altra banda, també poden inhibir la transcripció del transportador de glucosa GLUT4, la piruvat quinasa al fetge (L-PK o "*Liver Piruvate Kinase*"), l'àcid gras sintasa (FAS o "*Fatty Acid Synthase*") i la leptina.¹⁰⁹

Una de les maneres per les quals els àcids grassos estan actuant com a reguladors de l'expressió gènica és mitjançant l'activació directa de l'activitat transcripcional d'alguns receptors nuclears d'hormones, com el receptor activat per proliferadors peroxisomals o PPAR ("*Peroxisome Proliferating Activated Receptor*"). L'activació de PPAR mitjançant la

unió de determinats àcids grassos al seu domini d'unió a lligand, dona lloc a una activació de la transcripció de gens relacionats amb el propi metabolisme dels àcids grassos.

RESISTINA. Aquesta adipocitoquina, altrament coneguda com a FIZZ3, va ser descoberta per tres grups independents¹¹⁰⁻¹¹² i originàriament va ser descrita com a inductora de la resistència a la insulina.¹¹¹ Pertany a una família de proteïnes conegudes com a RELMs ("*Resistin-Like Molecules*") que semblen estar implicades en la regulació de processos inflamatoris.¹¹⁰ La resistina ha estat identificada sota dues isoformes: un hexàmer d'alt pes molecular més prevalent i, per altra banda, una de baix pes molecular i menys prevalent però més bioactiva.¹¹²

L'mRNA de la resistina pot ser trobada en diferents teixits de ratolí i humans, incloent-hi el teixit adipós, hipotàlam, melsa, múscul esquelètic, pàncrees i tracte gastrointestinal.¹¹³ Encara que la síntesi proteica de la resistina en ratolí sembla estar restringida als adipòcits, en humans també es troba a adipòcits, múscul, cèl·lules pancreàtiques i cèl·lules mononuclears com els macròfags. Tot i que no hi ha dades comparatives de nivells de proteïna,¹¹³ semblaria que en humans, les PBMCs ("*Peripheral-blood Mononuclear Cells*") presenten uns nivells d'expressió de resistina més alts que els dels d'adipòcits. Així

doncs, no quedaria clar quin és el principal tipus cel·lular responsable de la producció de resistina a nivell sistèmic.

A les PBMCs humanes, l'expressió de l'mRNA de la resistina és incrementada per les citokines proinflamàtories IL-1, IL-6 i TNF α , mentre que l'IFN γ (Interferó γ) i la leptina no hi tenen efecte.¹¹⁴ La inducció de la síntesi de resistina pot ser atenuada per l'administració d'agonistes de PPAR γ .^{113, 115} D'acord amb això, el tractament de pacients de diabetis mellitus de tipus II amb pioglitazona disminueixen els nivells de resistina en sèrum.¹¹⁶ També s'ha descrit que la suplementació de la dieta amb vitamina A inhibeix la producció de resistina al teixit adipós.¹¹⁷ A més, també hi ha altres factors que modulen l'expressió de la resistina com hormones tiroïdals, l'adrenalina, l'activació del receptor β 3-adrenèrgic, l'endotelina-1 i la insulina.

La resistina també s'ha trobat present en articulacions de pacients amb artritis reumatoide, correlacionant els seus nivells, amb el d'altres marcadors inflamatoris. Al seu torn, la resistina estimula la síntesi de TNF α IL-1, IL-6 i IL-12 a través de vies NF- κ B dependents de diferents tipus cel·lulars.^{114, 118}

Encara que la resistina s'ha identificat com un agent involucrat en el desenvolupament de resistència a la insulina i diabetis mellitus de tipus II

en ratolins,¹¹¹ això no és tan clar en humans.¹¹⁹⁻¹²¹ No obstant, el fet que mostri propietats proinflamàtories indicaria que pren part en processos inflamatoris.¹¹³ Cal dir que l'adiponectina i la resistina tenen efectes recíprocs a les cèl·lules endotelials: la resistina indueix l'expressió d'VCAM1 (*Vascular Cell-Adhesion Molecule 1*) i ICAM1 (*Intracellular Adhesion Molecule 1*) i la pentraxina 3, i per contra, l'adiponectina les reprimeix.¹²²

DIFERENCIACIÓ DEL TEIXIT ADIPÓS

D'acord amb el model estàndard, les cèl·lules mare es converteixen en preadipòcits quan perden la capacitat de diferenciar-se en altres llinatges mesenquimals com els miòcits, condrocits o osteòcits, transformant-se així en cèl·lules “determinades” a derivar cap a adipòcits.¹²³ Per a l'estudi del procés de diferenciació adipocitària, s'han fet servir diferents models de cultius cel·lulars, dins dels quals s'inclouen les línies cel·lulars preadipocitàries i els cultius primaris de cèl·lules precursors de l'estroma vascular del teixit adipós.¹²³

Els preadipòcits aïllats dels diferents dipòsits tenen potencials adipogènics diferents, la base dels quals, és completament desconeguda.¹²⁴⁻¹²⁶ Addicionalment, el comportament metabòlic de les cèl·lules madures es diferencia segons

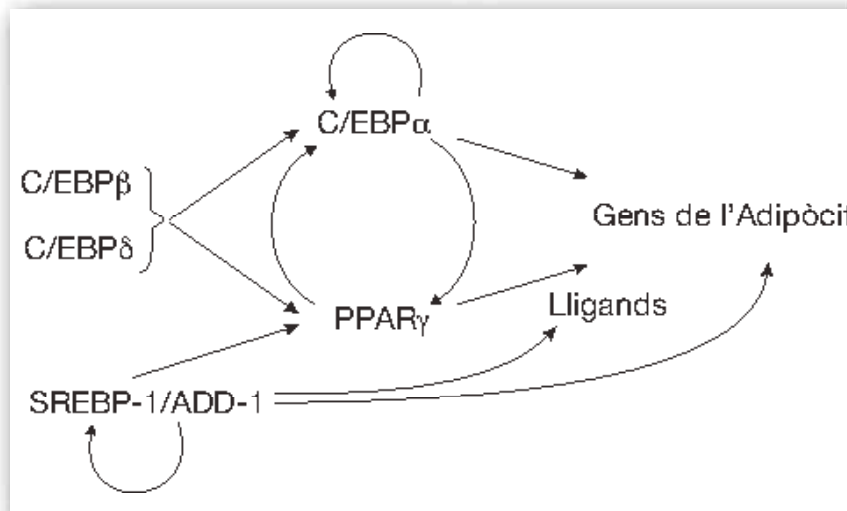


Figura 13.
Factors de transcripció involucrats a la cascada d'esdeveniments que donen lloc a l'inici del programa adipogènic.

la localització anatòmica. Per exemple, pel què fa a la capacitat de resposta a l'estimulació adrenèrgica, existeixen diferències entre la localització visceral, que és més sensible, i la subcutània.^{127, 128}

CASCADA D'ACTIVACIÓ DELS FACTORS DE TRANSCRIPCIÓ ADIPOGÈNICS

El procés d'adipogènesi, *in vitro*, segueix una seqüència de passos molt ben ordenats i caracteritzats. Inicialment, els preadipòcits proliferants surten del cicle cel·lular, normalment mitjançant processos d'inhibició per contacte, encara que s'ha demostrat que en cèl·lules sembrades a baixa densitat o que es troben en una suspensió de metilcel·lulosa també pot iniciar-se la diferenciació.¹²³ Per parar la proliferació d'aquestes cèl·lules i estimular l'adipogènesi, se les tracta amb inductors adipogènics que inclouen agonistes de glucocorticoides, agents que incrementen la concentració de

l'AMPc intracel·lular i una alta concentració de glucosa (per estimular els receptors d'IGF-1, factor de creixement insulínic 1). Lligands del receptor activat per proliferadors peroxisomals γ (PPAR γ), (per exemple les tiazolidinedions, TZDs) també són utilitzats de forma comuna per estimular la diferenciació adipocitària de línies cel·lulars preadipocitàries i cèl·lules en cultiu primari.

Els inductors de l'adipogènesi promouen l'expansió dels preadipòcits (una o dues rondes clonals) abans d'iniciar-se els processos d'activació transcripcional de gens marcadors de l'adipòcit i l'adquisició del fenotip adipocitari. El procés d'adipogènesi es descriu habitualment com una successió d'esdeveniments moleculars (Figura 13). La primera fase implicaria les proteïnes d'unió al CCAAT/*enhancer* β (C/EBP β) i C/EBP δ , i aquests factors de transcripció serien al seu temps els responsables de l'inici de la segona fase: l'activació dels factors de

transcripció PPAR γ i C/EBP α . Aquests dos, són els gens mestres de tot el procés de . Durant la primera fase, les cèl·lules fibroblàstiques s'arrodoneixen i incrementen els nivells dels mRNAs de marcadors adipogènics com LPL.^{129, 130} L'aparició de PPAR γ i C/EBP α activa l'expressió de si no tots, de la majoria dels gens que caracteritzen el fenotip adipocitari, com la FAS, la glicerofosfat deshidrogenasa, la acetil-CoA carboxilasa, el transportador de glucosa GLUT 4, el receptor d'insulina i la proteïna aP2/FABP (la proteïna citosòlica que lliga àcids grassos, específica de l'adipòcit), entre altres.¹³¹ A través d'aquest procés, al citoplasma de la cèl·lula van apareixent gotes lipídiques i al llarg del temps, aquestes aniran incrementant i fusionant-se fins a formar una o dues grans gotes lipídiques que ocuparan gran part del citoplasma.

C/EBP β sembla que és capaç d'induir l'expressió de C/EBP α , fins i tot en absència de PPAR γ ,¹³² encara que aquest fet és controvertit.¹³³ PPAR γ i C/EBP α al seu torn s'autoinduirien, així com també ho farien un respecte l'altre. L'expressió forçada de PPAR γ (en presència dels seus lligands) i C/EBP α estimula l'adipogènesi tot i en absència d'agents inductors exògens. Encara que PPAR γ és suficient per induir l'expressió de la majoria dels gens

adipocitaris, C/EBP α és necessari per conferir a l'adipòcit sensibilitat a la insulina.¹³⁴

FACTORS IMPLICATS EN L'ADIPOGÈNESI

C/EBPs. proteïnes d'unió a CCAAT/*enhancer* (C/EBPs) pertanyen a la família de factors de transcripció bZIP (*"basic leucine zipper"*), domini bàsic d'unió al DNA i cremallera de leucina. Actuen com a homo o heterodímers i la seva distribució tissular no es limita al teixit adipós.¹³⁵ No obstant, s'ha observat la regulació de l'expressió de diferents membres de la família C/EBP durant el procés d'adipogènesi, i estudis de pèrdua o guany de funció realitzats recentment indiquen que aquestes proteïnes juguen un paper molt important al desenvolupament de la cèl·lula adiposa.

L'expressió ectòpica de C/EBP β és suficient per a induir la diferenciació de cèl·lules 3T3-L1 sense que sigui necessari afegir inductors hormonals; en el cas de C/EBP δ , estudis similars indiquen que aquests agents prodiferenciadors són necessaris, però el procés d'adipogènesi es veu accelerat.¹³⁶ C/EBP β a més podria ser capaç de determinar les cèl·lules cap al llinatge de l'adipòcit així com promoure la seva diferenciació; l'expressió ectòpica de C/EBP β (i no δ) en cèl·lules fibroblàstiques NIH 3T3 facilita la diferenciació d'aquestes

cèl·lules en presència d'inductors hormonal.¹³⁷ Els fibroblasts d'embrions als que els manca C/EBP β o C/EBP δ mostren una certa pèrdua de potencial adipogènic, però les cèl·lules a les que els falten ambdues proteïnes tenen alterada de manera molt severa la seva capacitat per a diferenciar-se.¹³⁸ Els resultats que s'obtenen de ratolins deficientes en aquests factors de transcripció són bastant ambigus, encara que en general estarien d'acord amb el paper d'aquests factors en el desenvolupament de la cèl·lula adiposa. Aquests ratolins tenen un teixit adipós blanc normal, encara que el seu teixit adipós marró mostra una acumulació lipídica disminuïda i l'expressió del gen UCP-1 (marcador específic de l'adipòcit marró) és també disminuïda. En canvi, els ratolins deficientes en ambdós factors de transcripció presenten un fenotip molt més sever. Aproximadament el 85% dels animals moren durant el període perinatal per causes desconegudes i el 15% restant que sobreviu té el TAM considerablement reduït i el TAB disminuït.¹³⁸ És interessant destacar que la reducció del TAM es produeix a causa d'una reducció de l'acumulació lipídica, mentre que la reducció del TAB sembla estar provocada per una disminució del número de cèl·lules que quan es diferencien tenen unes dimensions, morfologia i expressió gènica normals.

La implicació de C/EBP α al procés d'adipogènesi està sustentada per resultats més definitius. La sobreexpressió de C/EBP α en cèl·lules 3T3-L1 dóna lloc a la seva diferenciació^{139, 140} i l'expressió d'RNA antisentit de C/EBP α bloqueja aquest procés.¹³⁹ C/EBP α s'uneix i transactiva a molts gens relacionats amb el fenotip adipogènic com: aP2/FABP, SCD1 (*“Stearoyl-Coa Desaturase 1”*), GLUT4, PEPCK, leptina i el receptor d'insulina. També li és atribuïda funció antimitòtica.^{90, 141}

Els animals que presenten una delecció del gen C/EBP α en homozigosi mostren una reducció molt important a l'acumulació de greix dels dipòsits del TAB i TAM.¹⁴² Aquests ratolins moren d'hipoglucèmia severa el primer dia com a conseqüència de la incapacitat de realitzar gluconeogènesi al fetge. La reducció d'adipositat sembla ser el resultat d'una lipogènesi disminuïda, ja que els marcadors de diferenciació adipocitària estan expressats als diferents dipòsits de greix d'aquests animals. La introducció del transgèn C/EBP α al fetge d'aquests ratolins *knock out* per C/EBP α augmenta la seva supervivència i encara que continuen presentant una manca de teixit adipós blanc,¹⁴³ el teixit adipós marró d'aquests ratolins es recupera.¹⁴⁴

ADD1/SREBP1. ADD1/SREBP1 (*“Adipocyte Differentiation and Determination factor 1/Sterol Regulatory Element Binding Protein 1”*) es va clonar independentment com a factor característic de la cèl·lula adiposa que s'uneix a elements de resposta caixa E^{145, 146} i com a component del fetge que s'uneix a elements de resposta a esterols (SREs o *“Sterol Response Element”*) de gens que regulen el metabolisme del colesterol.¹⁴⁷ ADD1/SREBP1 s'indueix durant l'adipogènesi i es regula per processos de dejú i realimentació in vivo.^{148, 149} El més probable és que la inducció d'ADD1/SREBP1 durant la realimentació estigui mitjançada per la insulina, ja que la insulina modula l'expressió d'ADD1/SREBP1 d'adipòcits en cultiu. La molècula completa d'aquest factor de transcripció és una molècula inactiva que s'uneix a la membrana del reticle endoplasmàtic. Una depleció d'esterols a la cèl·lula dona lloc a proteòlisi, translocació al nucli i activitat transcripcional de les SREBPs del fetge, però com s'activa ADD1/SREBP1 a l'adipòcit està encara per determinar. El què està clar és que ADD1/SREBP1 pot regular diferents gens relacionats amb el metabolisme dels àcids grassos i triacilglicèrids, com són FAS, ACO i la glicerofosfat aciltransferasa 1 i 2. El fet que almenys alguns d'aquests gens es trobin fortament regulats en paral·lel amb ADD1/SREBP1

suggereix que aquest factor és un enllaç entre els canvis nutricionals i el programa genètic lipogènic de la cèl·lula.

Addicionalment, ADD1/SREBP1 pot regular el procés d'adipogènesi, encara que no de manera tan important com PPAR γ o C/EBP α . L'expressió ectòpica d'ADD1/SREBP1 induïx la diferenciació de la cèl·lula adiposa, probablement induïnt directament l'expressió del gen PPAR γ a través de la unió d'aquest factor a elements de resposta caixa E al promotor de PPAR γ .¹⁵⁰ A més s'ha demostrat que una construcció dominant negativa de ADD1/SREBP1 bloqueja la diferenciació de les cèl·lules 3T3-L1.¹⁴⁹ És interessant destacar que medi condicionat de cèl·lules que expressen ADD1/SREBP1 és capaç d'activar la transcripció mitjançada per PPAR γ ,¹⁵¹ suggerint que ADD1/SREBP1 també està implicat en la producció del lligand endogen de PPAR γ .

PPAR γ . El receptor activat per proliferadors peroxisomals γ (PPAR γ) és un membre de la superfamília de receptors nuclears d'hormones i com la majoria dels factors de transcripció d'aquest tipus, PPAR γ necessita heterodimeritzar amb un altre receptor nuclear d'hormona, el receptor X de retinoids o RXR, per a unir-se al DNA i ser transcripcionalment actiu. El gen PPAR γ dona lloc a dos isoformes

proteiques, PPAR γ_1 i PPAR γ_2 , generades a partir de diferents inicis de transcripció i *splicing* alternatiu.¹⁵² Així com PPAR γ_1 s'expressa poc i en un espectre ampli de teixits, PPAR γ_2 s'expressa en grans quantitats al teixit adipós i es relaciona molt més amb el metabolisme lipídic.¹⁵² El receptor nuclear PPAR γ , de tots els PPARs, és el més adipogènic i ja s'expressa a l'etapa del preadipòcit. Línies fibroblàstiques infectades amb retrovirus que expressen PPAR γ i sota condicions adipogèniques, es diferencien a adipòcits.¹⁵³ *In vivo*, s'ha observat que encara que els ratolins deficientes al gen PPAR γ moren de manera prematura durant el desenvolupament, PPAR γ és necessari per al desenvolupament del teixit adipós,¹⁵⁴ i durant la diferenciació adipocitària de cèl·lules fibroblàstiques d'origen embrionari en cultiu¹³² i cèl·lules mare procedents d'aquests ratolins.¹³³

PPAR γ juga un paper crucial en la funció de la majoria, o de gairebé tots, els gens específics de cèl·lula adiposa. La unió de PPAR γ als *enhancers* dels gens aP2/FABP i PEPCCK és absolutament necessària per a la funció d'aquests gens a les cèl·lules adiposes en cultiu.¹⁵⁵ Aquest anàlisi per al gen de la PEPCCK és extensible *in vivo*, on l'activació d'aquest promotor al teixit adipós és dependent del lloc d'unió a PPAR γ , quan en altres teixits no ho és.¹⁵⁶

Els membres de la superfamília de receptors nuclears d'hormones són factors de transcripció dependents de l'activació per lligand i PPAR γ no n'és una excepció. PPAR γ pot ser activat per compostos sintètics anomenats tiazolidinedions (TZDs), com la troglitazona, la pioglitazona i la rosiglitazona (BRL49653), que es fan servir com a agents antidiabètics dins de la pràctica clínica.¹⁵⁷ Aquests compostos es van desenvolupar com a fàrmacs potencials per al tractament de la hiperlipèmia i la resistència a la insulina, sense que se'n sabés res del seu mecanisme d'acció; va ser més tard quan es va descobrir la seva relació amb PPAR γ . Les TZDs actuen disminuint la hiperglicèmia i hiperinsulinèmia, i augmenten la sensibilitat a la insulina al teixit adipós, fetge i múscul esquelètic. A nivell del teixit adipós, les TZDs augmenten la sensibilitat a la insulina, es creu que estimulants la diferenciació adipocitària i per tant produint adipòcits més petits i sensibles a la hormona. El TAB seria el seu marc d'actuació principal, on es vehicularia la resposta gràcies a la gran expressió de PPAR γ en aquest teixit.

Com s'esperaria d'un lligand de PPAR γ , el tractament de preadipòcits amb TZDs incrementa el grau i la taxa d'adipogènesi.^{158, 159} Això passa *in vivo* i *in vitro*, tot i que encara no està del tot clar si el potencial adipogènic d'aquests compostos està

relacionat amb la seva capacitat antidiabètica.

Malgrat que les TZDs resulten molt útils com a eines per a la investigació bàsica i per la teràpia de la resistència a la insulina, no s'ha aconseguit descobrir cap lligand endogen de PPAR γ amb característiques fisiològiques d'importància. De fet, la cerca de d'aquests compostos ha portat a la identificació d'alguns lligands naturals, incloent-hi la 15 deoxi- $\Delta^{12,14}$ prostaglandina J₂ o 15dPGJ₂.^{160, 161} Aquest eicosanoid és capaç d'unir-se i activar PPAR γ i pot promoure adipogènesi quan s'afegeix a fibroblasts en cultiu. Altres àcids grassos naturals, com l'àcid oleic i linoleic, poden unir-se igualment a PPAR γ .^{162, 163}

La distribució específica de lligands a nivell dels diferents teixits també pot determinar la funció de PPAR γ . D'aquesta manera, la disponibilitat de lligands naturals procedents de la dieta o alliberats per una situació hormonal determinada i, per tant, indicadors del marc cel·lular específic, provocarà una resposta mediada per PPAR γ molt més sensible i específica del teixit.

RXR. RXR (receptor X de retinoids) és un altre membre de la família de receptors nuclears d'hormones. Té tres isoformes α , β i γ , amb expressió diferencial en diferents teixits. Així, al TAM s'expressa preferentment RXR γ i al

TAB RXR α .¹⁶⁴ Com molts altres receptors nuclears d'hormones, el receptor RXR forma dímers amb sí mateix (homodímers) o heterodimeritza amb altres membres de la família de receptors. La capacitat d'RXR d'heterodimeritzar amb diversitat de receptors, permet a RXR actuar en nombroses vies com a integrador de senyal. L'acció adipogènica de PPAR γ es veu modulada per la capacitat transactivadora de l'heterodímer format per PPAR γ i RXR.¹⁵² El receptor RXR s'uneix al seu lligand natural, l'àcid 9-cis retinoic,¹⁵⁶ encara que el significat biològic d'aquesta unió és poc clara donats els baixos nivells d'aquest derivat *in vivo*. El 9-cis retinoic, no obstant, també és capaç d'unir-se a altres tipus de receptors nuclears, els receptors d'àcid retinoic o RAR. El paper del lligand de RXR durant el procés d'activació transcripcional sembla dependre del seu paper en la formació de dímers. Així, quan homodimeritza o heterodimeritza amb RXR o PPAR es manté sensible a l'acció de lligand, mentre que quan heterodimeritza amb el receptor de T₃ o el receptor de la vitamina D (VDR) es creu que juga un paper de *partner* necessari però insensible al lligand.^{165, 166}

En aquests últims anys s'ha demostrat que els lligands sintètics específics del receptor RXR tenen efectes en el tractament d'alteracions metabòliques, com la diabetis mellitus

de tipus II, efectes similars als produïts per les TZDs. Diferents estudis *in vitro* han mostrat que el tractament amb agonistes específics RXR de cèl·lules precursoras potencia la diferenciació de la cèl·lula adiposa blanca i marrona.¹⁶⁷⁻¹⁷⁰

FACTORS ACTIVADORS DE L'ADIPOGÈNESI

Insulina. La insulina és una hormona anabòlica que promou l'emmagatzemament de lípids al teixit adipós, però que a més actua com a factor de creixement. Aquesta acumulació de lípids no només es fa a través de l'estimulació de la captació de glucosa i d'incrementar l'activitat de la LPL, sinó que també es fa mitjançant la inhibició de la lipòlisi induïda per catecolamines. En experiments amb línies cel·lulars, la insulina actua a mode de modulador positiu del procés de diferenciació adipocitària.^{171, 172} Per contra, l'efecte de promoció del creixement per part de la insulina, a concentracions suprafisiològiques, podria portar-se a terme a través de l'activació del receptor d'IGF-1 (*"Insulin-like Growth Factor I"*).

L'activació del receptor d'IGF-1 (IGF-1R) als preadipòcits estimula l'adipogènesi. Les senyals adipogèniques d'IGF-1R actuen principalment a través del substrat del receptor d'insulina 1¹⁰² i d'IRS-2 activant la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3-K),¹⁰² l'activitat de la qual és

necessària pel procés de diferenciació.^{102, 173, 174}

Àcids Grassos. La ingesta d'una dieta rica en greixos, concretament d'àcids grassos saturats, porta a una hipertròfia i hiperplàsia del teixit adipós. No obstant, fins a quin punt els àcids grassos són capaços d'afectar la diferenciació *de novo* dels adipòcits, és un fet que encara no es coneix del tot. Els àcids grassos poliinsaturats, que són menys efectius a l'hora d'incrementar el número d'adipòcits *in vivo*, són molt més efectius en l'estimulació de la diferenciació dels preadipòcits en cultiu que els àcids grassos saturats,^{175, 176} un efecte que, per altra banda, semblaria estar mitjançat per l'habilitat dels àcids grassos poliinsaturats per actuar com a lligands o precursors de lligands de PPAR γ .

Prostaglandines. Per contra de l'efecte general de los ácidos grasos poliinsaturados, las prostaglandinas tenen un efecte molt més específic en la diferenciació del preadipòcit. La prostaciclina (PGI₂) és un metabòlit de l'àcid araquidònic del teixit adipós i estimula l'adipogènesi unint-se al receptor IP de membrana dels preadipòcits, que activa l'adenilat ciclase. El conseqüent augment d'AMPc intracel·lular promou la inducció de C/EBP β i C/EBP δ .¹⁷⁷ A més, la PGI₂ pot estimular la diferenciació adipocitària gracies a la seva habilitat

d'actuar com a lligand de PPAR γ .¹⁷⁸ Els adipòcits secreten grans quantitats d'angiotensinogen, un precursor de la angiotensina, que a més del seu paper vasoconstrictor, promou el procés adipogènic mitjançant l'estimulació de la secreció de PGI₂ dels adipòcits.¹⁷⁹

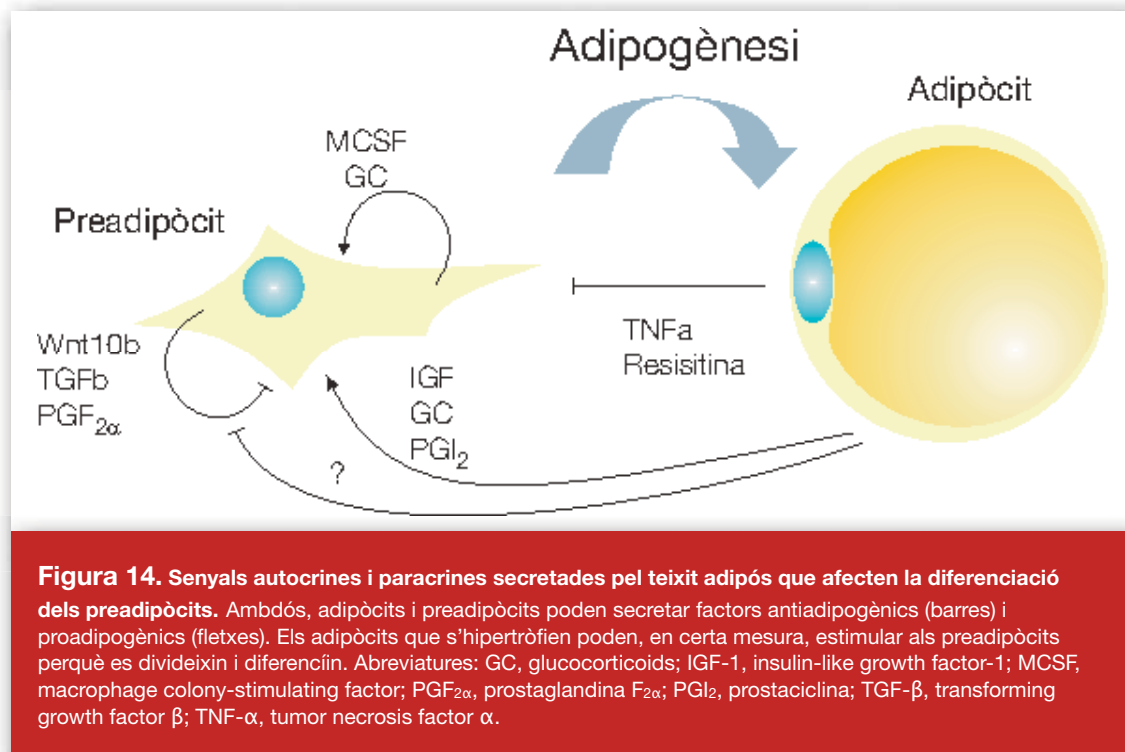
Glucocorticoids. Els glucocorticoids són potents inductors de l'adipogènesi *in vitro* i un hipercorticosteroidisme està associat a l'acumulació de teixit adipós visceral *in vivo*. Els receptors de glucocorticoids s'expressen als preadipòcits humans primaris,¹⁸⁰ als preadipòcits de diferents línies cel·lulars establertes i a més, activen l'expressió de C/EBP δ ¹⁸¹ i PPAR γ .¹⁸² L'enzim 11 β -HSD1 ("11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase 1"), que catalitza la conversió de la cortisona inactiva a la forma activa de cortisol, i per tant, sensibilitza els teixits a l'acció dels glucocorticoids, es troba a preadipòcits primaris i a adipòcits. La síntesi d'11 β -HSD1 està significativament incrementada durant la diferenciació de línies cel·lulars de preadipòcits,¹⁸³ probablement mitjançant l'activació transcripcional de C/EBP α .¹⁸⁴ Addicionalment, l'obesitat està associada amb un increment d'11 β -HSD1 al teixit adipós de rosegadors i humans.^{185, 186} Les cèl·lules de l'estroma vascular del greix omental expressen alts nivells d'activitat de l'11 β -HSD1 i, encara que els nivells

de cortisol en plasma de pacients obesos no són significativament alts, el cortisol generat pels preadipòcits i adipòcits de la localització omental podrien actuar de manera paracrina estimulants així la diferenciació adipocitària i promovent l'obesitat abdominal.¹⁸⁷

FACTORS INHIBIDORS DE L'ADIPOGÈNESI

RA. L'àcid retinoic (RA) s'obté de la dieta com a derivat de la vitamina A, per oxidació enzimàtica del retinol. Al llarg del temps, s'ha identificat l'àcid retinoic com a agent amb capacitat per modificar diferents processos de diferenciació, incloent-hi les fases terminals de la diferenciació de l'adipòcit. Quan es fa servir a concentracions suprafisiològiques, dona lloc a la inhibició de la diferenciació adipocitària de línies cel·lulars i de preadipòcits primaris de porc.^{188, 189} Ha estat àmpliament demostrat que l'RA actua durant les fases tempranes del procés de diferenciació ja que només és capaç de bloquejar la diferenciació quan s'afegeix als estadis primerencs del procés, mentre que si les cèl·lules ja han arribat als estadis finals de diferenciació, el tractament amb RA ja no és efectiu.^{91, 190}

Contràriament a l'efecte inhibitori de l'RA a concentracions suprafisiològiques, concentracions properes a la constant de dissociació del receptor resulten ser un potent



inductor de diferenciació per les cèl·lules Ob17 i preadipòcits de rata.¹⁹¹ Recentment, s'ha descrit que pretractament de cèl·lules ES embrionàries amb àcid retinoic durant un curt període de temps, resulta en un alt nivell de diferenciació, indicant que l'RA podria jugar un paper crític al llarg del procés de diferenciació adipocitària.¹⁹² En aquest cas, el paper de l'RA als primers estadis del procés de diferenciació és distingible del paper que porta a terme al llarg de la diferenciació terminal de l'adipòcit descrita anteriorment, ja que ni les hormones adipogèniques ni els potents activadors de PPARγ podrien substituir l'àcid retinoic.^{192, 193}

Pref-1. El factor preadipocitari 1 (Pref-1) és un inhibidor de la diferenciació adipocitària¹⁹⁴ i és

sintetitzat com una proteïna de membrana plasmàtica que conté sis repeticions d'EGF al domini extracel·lular. Aquest domini extracel·lular és proteolitzat i dona lloc a dos productes solubles de 50 i 25 kDa. Pref-1 s'expressa abundantment a preadipòcits 3T3-L1 i aquesta expressió va disminuint al llarg del procés de diferenciació, fins a nivells indetectables a les cèl·lules madures. Només la forma de 50 kDa és capaç d'inhibir la diferenciació.¹⁹⁵ La dexametasona, un agent diferenciador agonista de glucocorticoids, inhibeix la transcripció de Pref-1 promovent-ne així l'adipogènesi.

Wnts. La família de glicoproteïnes secretades Wnt actua a través de mecanismes autocrins i paracrins per influenciar el desenvolupament de diferents tipus

cel·lulars.¹⁹⁶ Concretament, l'expressió ectòpica del gen *Wnt1* dona lloc a una potent repressió de la diferenciació dels preadipòcits en presència d'inductors de diferenciació.¹⁹⁷ En aquest mateix sentit, tractaments genètics i farmacològics que mimetitzen la via de senyalització *Wnt* també n'estronquen la seva diferenciació.^{197, 198}

L'expressió de *Wnt* no afecta la inducció de *C/EBPβ* ni *C/EBPδ*, però sí que ho fa la inducció dels factors de transcripció *C/EBPα* i *PPARγ*. Així, la inhibició de la senyalització *Wnt* als preadipòcits porta a la diferenciació espontània d'aquestes cèl·lules, indicant això que, els preadipòcits produeixen *Wnt* endogen que inhibeix la diferenciació. El gen *Wnt10b* semblaria ser el millor candidat de la família, donada l'alta expressió d'aquest gen en preadipòcits proliferants i confluent, que és ràpidament inhibida després de la inducció de la diferenciació.¹⁹⁷

GH. S'ha comprovat que l'hormona del creixement (GH) disminueix la quantitat de teixit adipós *in vivo*, probablement mitjançant l'activació de la lipòlisi. No obstant, la GH inhibeix la diferenciació de preadipòcits en cultiu primari, suggerint que l'adipogènesi *de novo* i *in vivo* també està inhibida. Per contra, la GH estimula la diferenciació d'altres línies cel·lulars

de preadipòcits derivades d'embrions, probablement demostrant l'estat inicial de desenvolupament d'aquestes cèl·lules.¹⁹⁹ És interessant destacar que l'obesitat correlaciona amb una menor secreció de GH, i que, la pèrdua de pes ho fa amb una major secreció d'aquesta.²⁰⁰

Altres. Tant les citoquines inflamatòries *TNFα*, *IL-1*, *IL-6*, *IL-11* i *IFNγ*,²⁰¹⁻²⁰³ com *TGFβ* ("Transforming Growth Factor β "),²⁰⁴ i *PGF_{2α}*²⁰⁵ són altres agents inhibidors de l'adipogènesi que juguen un paper prou important.

TAM: Teixit Adipós Marró

L'eutèrmia, o capacitat de mantenir i regular la temperatura corporal, és una funció fisiològica bàsica dels animals superiors. Els principals mecanismes de generació de calor són: la termogènesi associada a tremolor, consistent en la contracció muscular involuntària i la termogènesi no associada a tremolor.²⁰⁶ Aquest últim mecanisme està lligat a l'activitat del teixit adipós marró (TAM) i juga un paper crític en el balanç energètic, encara que la seva importància depèn de l'espècie, l'edat i la mida de l'organisme. La funció termogènica del teixit adipós marró és fonamental pel manteniment de la temperatura en mamífers de mida

petita, en els quals la relació superfície/volum els és desfavorable, i durant el període neonatal i la infància de moltes espècies.²⁰⁷ Als nounats humans, el teixit és molt abundant i presenta una gran activitat, però la seva importància va disminuint progressivament amb l'edat. En animals adults d'altres espècies, la producció de calor per part del teixit té una funció molt important en l'adaptació a ambients freds, a més de participar al despertar dels animals en hibernació.

El color marró del TAM es deu a l'elevada vascularització del teixit i al gran número de mitocòndries presents. La taxa de respiració de les mitocòndries és molt elevada i exigeix un bon subministrament d'oxigen, garantit per l'elevada taxa de perfusió del sistema vascular. El teixit adipós marró també presenta una gran inervació simpàtica, així com una alta densitat de receptors α i β -adrenèrgics situats a prop de les terminacions simpàtiques.²⁰⁸

La capacitat del teixit adipós per produir calor es deu a un desacoblament regulat entre la cadena respiratòria i la fosforilació oxidativa. El desacoblament de la mitocòndria del TAM es caracteritza per una via de transport de protons present a la membrana mitocondrial interna de les cèl·lules d'aquest teixit.²⁰⁹ L'activació d'aquesta via dissipa el gradient electroquímic de protons generat durant la respiració

mitocondrial i l'energia generada es perd en forma de calor. El sistema de transport de protons es va identificar com una proteïna de 32kDa present exclusivament en el teixit adipós marró. Es va demostrar que la presència d'aquesta proteïna a la membrana mitocondrial era elevada per exposició al fred i que la seva activitat era inhibida per nucleòtids de la família de les purines.²¹⁰ Aquesta proteïna va rebre el nom d'UCP ("uncoupling protein")²¹¹ i és el marcador bioquímic i molecular del teixit adipós marró. Actualment, donat que s'han identificat noves proteïnes amb una gran similitud amb UCP se la denomina UCP-1.²¹²

REGULACIÓ DEL TAM

La capacitat termogènica del teixit adipós marró depèn de la temperatura ambiental, de l'estadi de desenvolupament i de la ingesta, i aquests factors influeixen tant la quantitat de proteïna desacobladora present a la membrana mitocondrial com a la seva activitat i expressió dins del teixit.

El principal estímul fisiològic del teixit adipós marró és la disminució de la temperatura ambiental, que s'associa a un fort increment dels nivells d'UCP-1. Animals mancats de teixit adipós marró o genèticament deficientes en UCP-1, presenten deficiències en la termogènesi i intolerància al fred.^{213, 214}

Una exposició aguda de l'animal al fred provoca una ràpida resposta termogènica del teixit adipós marró, un increment de l'activitat del sistema nerviós simpàtic i un increment del flux sanguini en el teixit. Durant un procés d'estrès tèrmic perllongat, es produeix una proliferació dels preadipòcits i un increment de la síntesi de proteïnes, específicament, d'UCP-1, LPL, la iodetironina 5'-desiodasa i enzims implicats en lipòlisi,²¹⁵ acompanyat de la proliferació de les mitocondries i altres orgànuls.

El teixit adipós marró participa en la termogènesi adaptativa induïda per la dieta, regulant el pes corporal.²¹⁶ La ingesta d'aliments incrementa l'activitat del sistema nerviós simpàtic del TAM, estimulant l'activitat termogènica del teixit.²¹⁷ Animals sotmesos a llargs períodes de temps amb dietes hipercalòriques presenten hipertròfia del teixit amb uns nivells alts de la proteïna i de l'mRNA d'UCP-1.²¹⁸ Així mateix, en situacions de dejú²¹⁹ o de dieta hipocalòrica²²⁰ es dona una disminució dels nivells d'UCP-1. Altres evidències de la implicació del teixit adipós marró en la termogènesi adaptativa induïda per la dieta s'obtenen d'estudis realitzats amb diferents soques de ratolins genèticament obesos, com els ratolins ob/ob, deficientes per al gen de la leptina, que presenten l'activitat simpàtica del TAM disminuïda.

Clàssicament, s'ha considerat a la noradrenalina (NA) com a principal via de regulació de l'activitat termogènica del TAM, mitjançant el control de l'expressió d'UCP-1, però l'activitat d'aquesta proteïna ve modulada per altres factors que actuen de manera independent o conjunta amb la NA. La regulació del gen UCP-1 depèn de les exigències termogèniques de l'organisme, a més que està lligada al grau de diferenciació del teixit i d'una expressió exclusiva dins de l'adipòcit marró.

REGULACIÓ ADRENÈRGICA

La capacitat d'un adipòcit marró per produir calor depèn de l'activitat de la proteïna UCP-1 i de la via de degradació de triacilglicèrids. L'activació noradrenèrgica del teixit de manera aguda genera un increment de l'AMPc intracel·lular, provocat per la unió de la NA als seus receptors. En adipòcits madurs, aquest increment dona lloc a una activació de l'adenilat ciclase que, al seu temps, origina una estimulació de l'activitat de la lipasa sensible a les hormones (HSL) i el corresponent augment dels àcids grassos lliures. Aquests àcids grassos, estimulen directament l'activitat de la proteïna desacobladora UCP-1 present a la mitocondria, i per altra banda, serveixen de substrat en l'oxidació mitocondrial. Quan l'estimulació del teixit a través de la

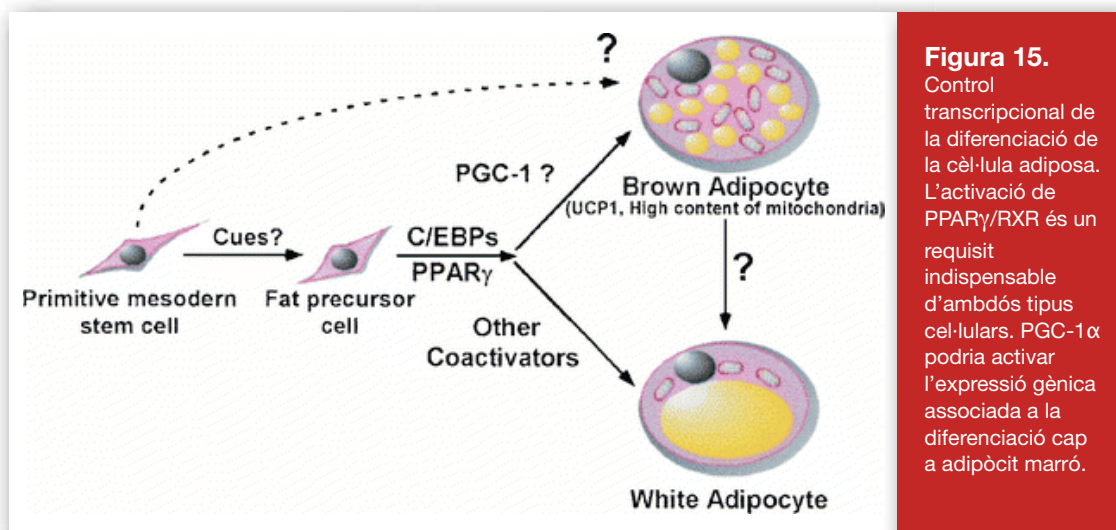
NA és crònica, s'incrementa el contingut d'UCP-1 a les mitocòndries dels adipòcits madurs, es dona hiperplàsia del teixit i diferenciació del *pool* de cèl·lules precursors. La noradrenalina actua modificant la transcripció de diferents gens (entre els quals hi ha UCP-1) i l'expressió de factors de transcripció relacionats amb diferenciació i proliferació.²²¹

Als adipòcits marrons, la noradrenalina interactua amb els tres receptors adrenèrgics: β , α_1 i α_2 . Aquests receptors estan associats a diverses vies de senyalització de l'adipòcit marró.

L'adipòcit marró expressa els tres subtipus de receptors β -adrenèrgics, β_1 , β_2 i β_3 però la participació dins de la resposta termogènica és restringida als receptors β_1 i β_3 -adrenèrgics. La via de transducció de senyal dels dos subtipus està lligada a un increment dels nivells d'AMPc, a través de l'estimulació de l'adenilat ciclasa mitjançant proteïnes Gs, i la seva expressió a la cèl·lula es relaciona amb el grau de diferenciació de l'adipòcit. Els receptors β_3 -adrenèrgics són els que estan en major número dins dels adipòcits marrons madurs ja que participen en la resposta a l'estimulació aguda i crònica del teixit. L'increment dels nivells d'AMPc per l'activació del receptor β_3 -adrenèrgic dona lloc a l'activació de la proteïna quinasa A.¹⁴³ Així, la PKA activa és capaç

d'activar l'HSL, donant lloc a un increment de la lipòlisi i una conseqüent activació de la termogènesi.²²² Per altra banda, la PKA fosforila el factor de transcripció CREB (proteïna d'unió a CRE)²²³ que activa l'expressió del gen UCP-1,²²⁴⁻²²⁶ així com augmenta l'expressió de gens relacionats amb la diferenciació.^{221, 227, 228} Els receptors β_1 -adrenèrgics estan involucrats en el fort increment de la divisió cel·lular que s'observa al teixit adipós marró exposat al fred. Als preadipòcits, que expressen els receptors β_1 -adrenèrgics, però no els β_3 , l'activació adrenèrgica del teixit a través dels receptors β_1 estimula la proliferació i provoca hiperplàsia del teixit.²²⁹

L'adipòcit marró també expressa els dos subtipus de receptors α -adrenèrgics, α_1 i α_2 . L'activació dels receptors α_2 -adrenèrgics estimula la proteïna Gi, inhibint l'adenilat ciclasa i atenuant així els nivells d'AMPc produïts durant l'estimulació simpàtica del teixit. L'increment dels nivells d'AMPc dependrà del balanç entre l'expressió dels receptors i el tipus d'adenilat ciclasa presents a la membrana de la cèl·lula. L'estimulació dels receptors α_1 -adrenèrgics dona lloc a un increment de la producció d'inositol-trifosfat²³⁰ i un augment dels nivells de calci intracel·lular.²³¹ El número de receptors α_1 augmenta en situacions d'aclimatació al fred i s'ha demostrat

**Figura 15.**

Control transcripcional de la diferenciació de la cèl·lula adiposa. L'activació de PPAR γ /RXR és un requisit indispensable d'ambdós tipus cel·lulars. PGC-1 α podria activar l'expressió gènica associada a la diferenciació cap a adipòcit marró.

que l'activació simultània dels receptors β i α_1 -adrenèrgics té com a resultat un increment de l'efecte produït per l'AMPc.²³²

PGC-1 α . El coactivador del receptor activat per proliferadors peroxisomas γ (PPAR γ)-1 α , és un coactivador recentment identificat que s'ha demostrat que està implicat en múltiples respostes biològiques relacionades amb l'homeòstasi energètica, la regulació tèrmica i el metabolisme de la glucosa. És una proteïna de 90kDa que s'expressa al múscul esquelètic, cor, ronyó i teixit adipós marró, però no al teixit adipós blanc dels rosegadors.²²⁷

Un coactivador transcripcional és una proteïna o conjunt de proteïnes que mitjançant la interacció amb factors de transcripció, incrementa la taxa de transcripció de determinats gens, exercint aquest efecte sense que s'hagi d'unir a cap seqüència específica del DNA. Així, PGC-1 α és capaç de coactivar, entre altres, diversos receptors nuclears,

com els PPARs o el receptor de la hormona tiroïdal (TR),²²⁷ regulant així l'expressió de nombrosos gens.

La funció dels receptors adrenèrgics al TAM i al múscul esquelètic és crítica per la resposta d'aquests teixits al fred i a alteracions de la dieta. En aquest sentit, s'ha observat que PGC-1 α s'indueix considerablement, a nivell transcripcional, al teixit adipós marró i al múscul esquelètic de ratolís que han estat exposats a baixes temperatures. D'acord amb aquestes dades *in vivo*, l'mRNA de PGC-1 α s'indueix a les línies cel·lulars d'adipòcit marró tractades amb isoproterenol, un agonista β -adrenèrgic.²²⁷ Aquest efecte està mitjançat per receptors β_3 -adrenèrgics, ja que animals deficientes d'aquest tipus de receptor no es veuen afectats per la inducció de PGC-1 α pel fred al TAM.²³³ A més, injeccions amb un agonista β_3 específic indueixen específicament l'expressió de PGC-1 α al TAM.²³⁴

Como ja s'ha comentat, PGC-1 α coactiva diferents receptors nuclears d'hormones, entre ells, els receptors nuclears que s'uneixen al promotor d'UCP-1 i que en modulen la seva expressió. Així mateix, s'ha proposat que part de l'efecte de l'AMPc sobre la regulació transcripcional d'UCP-1 està mitjançada per la inducció de PGC-1 α i la subsegüent interacció d'aquest amb els receptors nuclears d'hormones PPAR γ , PPAR α , RAR i TR.

La introducció de PGC-1 α a les cèl·lules adiposes 3T3-F442A en cultiu dona lloc a una inducció de l'expressió d'UCP-1 i d'enzims mitocondrials claus de la cadena respiratòria, així com també estimula un increment de la quantitat de mtDNA.²²⁷ Quan s'introdueix PGC-1 α a les cèl·lules musculars, es dona una inducció important de l'expressió de NRF-1, NRF-2 i TFAM, factors de transcripció claus de la biogènesi i funció mitocondrial.²³⁵

Simultàniament als efectes de PGC-1 α sobre la respiració mitocondrial a les cèl·lules de múscul esquelètic, aquest coactivador també incrementa l'expressió del transportador de glucosa sensible a la insulina (GLUT4) i augmenta la de glucosa.²³⁶ A més, el tractament de cèl·lules musculars amb diverses citoquines activa l'activitat transcripcional de PGC-1 α ,

mitjançant la fosforilació directa de la p38MAPK, provocant un augment de l'expressió de gens lligats al desacoblament mitocondrial i a la despesa energètica.²³⁷

Una de les qüestions clau sobre la funció de PGC-1 α és si aquest coactivador és el que determina que un preadipòcit esdevingui adipòcit marró o segueixi diferenciant-se cap a adipòcit blanc (figura 15). Existeixen diverses observacions que apuntarien a que PGC-1 α està involucrat en la decisió d'aquesta divergència. En primer lloc, PGC-1 α és l'única proteïna descrita fins al moment capaç d'activar potentment l'expressió d'UCP-1.²²⁷ Així mateix, quan s'afegeix PGC-1 α a les cèl·lules adiposes blanques, s'indueix l'expressió endògena d'UCP-1 i s'activa la biogènesi mitocondrial, essent ambdues característiques típiques de l'adipòcit marró.²³⁸ Per últim, PGC-1 α està regulat per l'activació de receptors β -adrenèrgics i AMPc intracel·lular, que se sap que indueixen l'expressió d'UCP-1 i la hipertròfia del teixit adipós marró.

REGULACIÓ PER HORMONES TIROIDALS

El teixit adipós marró conté l'enzim iodetironina 5'-desiodasa (tipo II),²³⁹ d'activitat elevada, pel què, el TAM és capaç de generar la seva pròpia hormona tiroïdal activa (3,5,3'-triiodetironina, T₃), a partir de tiroxina (T₄). A vegades aquest teixit

pot ser una font important d'hormona alliberada en sang.²⁴⁰ D'aquesta manera, el TAM pot influenciar l'estat termogènic d'altres òrgans que no tinguin la capacitat de generar T₃ pròpia.

L'hormona tiroïdal és necessària per la termogènesi del teixit adipós marró induïda pel. De fet, els animals amb afecció hipotiroïdal moren al ser exposats a baixes temperatures. A més, la T₃ actua sinèrgicament amb la noradrenalina a diferents nivells: l'activació de l'adenilat ciclase, amb l'efecte de l'AMPc sobre la lipòlisi i amb l'acció termogènica dels àcids grassos sobre la mitocòndria.²⁴¹

L'efecte del fred sobre l'acció de la iodotironina 5'-desiodasa està mitjançat per receptors α_1 i β -adrenèrgics.²⁴² Com a conseqüència d'una activació simpàtica, l'activitat de l'enzim és augmentada per mitjà d'un increment de la síntesi d'aquest. Així, l'hormona T₃ produïda en aquestes condicions és suficient per saturar els seus receptors nuclears i activar, juntament amb la noradrenalina, l'expressió del gen UCP-1.^{239, 243} Això passa quan la T₃ s'uneix als seus elements de resposta al promotor d'aquest gen.²⁴⁴⁻²⁴⁶

REGULACIÓ PER ÀCID RETINOIC

L'àcid retinoic participa tant a la diferenciació i proliferació cel·lular d'uns quants teixits de mamífer com a la seva morfogènesi.^{247, 248} El 9-*cis*

RA i l'*all-trans* RA són els principals isòmers de l'àcid retinoic amb funcionalitat biològica.

L'àcid retinoic actua modificant l'expressió dels seus gens diana a nivell transcripcional, a través de l'activació dels factors de transcripció depenents de lligands, els receptors de retinoic. Aquests receptors pertanyen a la superfamília de receptors nuclears i es classifiquen en dues subfamílies: els RAR i els RXR. Els isòmers presenten una afinitat específica per a cadascun dels receptors: *all-trans* RA realitza els seus efectes a través de RAR gràcies a la formació de l'heterodímer RAR/RXR i el 9-*cis* RA està considerat com un "pan-agonista" ja que s'uneix tant a receptors RAR com RXR. Així, el 9-*cis* RA activa els heterodímers RAR/RXR, els heterodímers RXR/RXR i aquells heterodímers als que un dels monòmers sigui RXR i l'altre algun altre membre de la superfamília de receptors nuclears d'hormones, com els PPARs.²⁴⁹

Tant el TAM com el TAB participen de forma activa, conjuntament amb el fetge, a l'homeòstasi dels retinoids i són teixits diana de la seva activitat. El teixit adipós representa el 15-20% del total de l'emmagatzemament de retinoids corporal,²⁵⁰ reserva que es troba majoritàriament en forma de retinol.²⁵⁰ El retinol que arriba a la cèl·lula adiposa prové principalment

del fetge, la cèl·lula el capta i el transforma en 9-*cis* o *all-trans* RA. El teixit adipós presenta una elevada expressió de les proteïnes implicades al metabolisme dels retinoids, la CRBP (“*Cytoplasmatic Retinol-Binding Protein*”) i la RBP (“*Retinol-Binding Protein*”). S’ha comprovat que *in vitro*, els adipòcits marrons i blancs poden sintetitzar RBP i la secreten al medi de cultiu,²⁵⁰ a part que el retinol pugui ser mobilitzat pels adipòcits.²⁵¹ Aquestes dades suggereixen que els teixits adiposos estan involucrats no només en l’emmagatzemament sinó també en la movilització i transport dels retinoids, regulant-ne així la seva homeòstasi. Per altra banda, els teixits adiposos també contenen àcid retinoic que deriva de la pròpia síntesi local²⁵² i a concentracions similars a les del fetge i altres teixits que responen a l’àcid retinoic. Per tant, considerant la massa total dels teixits adiposos, aquests poden contribuir de manera important al metabolisme de l’àcid retinoic.

Com s’ha comentat, l’RA ha estat àmpliament identificat com un inhibidor del final de la diferenciació adipocitària de cultius primaris com de línies cel·lulars de preadipòcits, com per exemple, 3T3-L1 i 3T3-F442A.^{189, 190, 253-255} Estudis fets amb lligands RAR i RXR indiquen que la inhibició de la diferenciació està mitjançada a nivell de RAR, ja que per contra, agonistes de RXR promouen la diferenciació. Això es

veu reforçat pel patró d’expressió dels subtipus de RAR i RXR durant la diferenciació adipocitària: RAR α i RAR γ es veuen reprimits, i RXR α i RXR γ estan induïts juntament a l’increment de sensibilitat de l’heterodímer RXR/PPAR γ .^{254, 256, 257} En cèl·lules 3T3-L1, el bloqueig de l’adipogènesi per part de l’*all-trans*RA només és efectiu quan és subministrat durant els primers estadis de diferenciació (juntament als agents inductors). No obstant, l’expressió ectòpica de RAR en aquestes cèl·lules eixampla el període de sensibilitat d’aquestes cèl·lules a l’àcid retinoic,²⁵⁶ indicant així que la repressió de l’expressió de RAR contribueix a la insensibilització vers l’àcid retinoic. Més encara, l’àcid retinoic evita l’adipogènesi quan és afegit a cèl·lules 3T3-L1 que expressen ectòpicament C/EBP α i PPAR γ , i que encara no han arribat a confluència.²⁵⁸ Així doncs, l’expressió de C/EBP α i PPAR γ per sí sola, no seria suficient per prevenir la inhibició de l’àcid retinoic en adipòcits proliferants, mentre que la sortida permanent del cycle cel·lular dóna lloc a la insensibilització vers la inhibició de la diferenciació adipocitària de l’àcid retinoic.

El bloqueig dels principals passos moleculars de l’adipogènesi resultants de la inhibició de l’àcid retinoic inclouen la inhibició de C/EBP α i la inducció de PPAR γ .^{259, 260} Les dades experimentals apunten a

que aquests efectes, almenys en part, són provocats per l'acció de l'RA sobre la transcripció de C/EBP α .²⁵⁹ Altres vies que podrien contribuir al bloqueig de l'adipogènesi que també estarien afectades podrien ser: la repressió dels receptors d'hormones tiroïdals,²⁶¹ la inducció de c-jun²⁶² i la inducció d'apoptosi.²⁶³ L'àcid retinoic també inhibeix l'expressió de diferents gens adipogènics com l'adipsina,²⁶⁴ la lipoproteïna lipasa,²⁶⁵ la resistina,¹¹⁷ i la leptina.²⁶⁶

Així mateix, recentment s'ha descrit que l'administració *in vivo* d'*all-trans* RA a ratolins provoca una remodelació del teixit adipós blanc, fent que aquest adquireixi característiques pròpies del TAM, com per exemple, un augment d'UCP-1, PPAR α i PGC-1 α .²⁶⁷

TEIXIT ADIPÓS MARRÓ HUMÀ

Com ja s'ha comentat anteriorment, els humans només presenten acumulacions de teixit adipós marró durant el període neonatal, principalment ubicats dins la cavitat toràctica, al voltant dels principals vasos sanguinis. No obstant, resultats recents indiquen que certs emplaçaments de teixit adipós aparentment només constituïts per teixit adipós blanc, podrien presentar cèl·lules amb característiques de teixit adipós marró ja que mitjançant tècniques de "Real Time" PCR s'ha detectat la

presència de cèl·lules aïllades amb capacitat d'expressar UCP-1.^{268, 269} A més, humans amb feocromocitoma, una situació patològica caracteritzada per una elevada activació adrenèrgica, o amb hibernomas, tumors de TAM, desenvolupen grans acúmuls de teixit adipós marró que expressen UCP-1, indicant que l'expressió d'UCP-1 pot induir-se en certs tumors i situacions d'alteracions metabòliques.²⁷⁰ No obstant, estudis recents amb PET ("Positron Emission Tomography") indiquen que la presència de TAM a humans adults, en general, podria ser més important del que s'ha estat assumint els darrers anys.²⁷¹

No gens menys, és interessant destacar que existeix un polimorfisme en la regió promotora d'UCP-1 que s'ha observat que es troba associat a obesitat.²⁷⁰ Això situaria la proteïna UCP-1 i al teixit adipós marró com a agent actiu del manteniment del pes corporal i de la regulació del balanç energètic.

LIPODISTRÒFIA

Introducció

Les lipodistròfies són malalties que es caracteritzen per la pèrdua i acumulació selectiva de teixit adipós en diferents localitzacions anatòmiques. Aquestes síndromes són clínicament molt heterogènies, ja siguin adquirides o congènites, i els pacients afectats es caracteritzen per tenir predisposició a la resistència a insulina i complicacions associades: diabetis mellitus, dislipidèmia, esteatosi hepàtica i acantosi nigricans. En dones, també es poden desenvolupar trets de la síndrome de l'ovari policístic: hirsutisme, oligomenorrea i ovari policístic.

Més d'un segle després de la primera descripció d'un fenotip clínic lipodistròfic²⁷² s'estan començant a comprendre les bases cel·lulars i moleculars subjacents als diferents tipus de lipodistròfies. Per altra banda, les bases genètiques de moltes d'aquestes síndromes han estat elucidades a través de la caracterització sistemàtica de fenotips, és a dir, basant-se en diferents aspectes clínics i patrons diferencials de distribució del teixit adipós, juntament amb tècniques de biologia molecular i seqüenciació del genoma.

Lipodistròfies Adquirides

Generalment les lipodistròfies adquirides són més comuns que les congènites, però tot i així, cada lipodistròfia adquirida té un quadre clínic i un mecanisme patogènic particulars.

LIPODISTRÒFIA ASSOCIADA A L'HIV-1

Inicialment, el terme “síndrome lipodistròfica” associat a HIV, va ser introduït per descriure un quadre clínic complex que incloïa la redistribució de teixit adipós i alteracions metabòliques que es donaven en pacients infectats per l'HIV i que, sota tractament HAART, rebien inhibidors de proteasa (HALS, “*HIV-1/HAART Associated Lipodystrophy Syndrome*”).²⁷³ Més tard, altres característiques com l'osteopènia i la hiperlactatèmia s'han inclòs dins del diagnòstic, però tot i així, no hi ha un clar consens per a la definició d'aquesta síndrome. En part, això es deu a que no tota la simptomatologia es manifesta per complert ni al mateix temps en tots els pacients, i de fet, en la pràctica clínica, part de la diagnosi de lipodistròfia respon a una interpretació més personal que a una classificació totalment avaluada.

QUADRE CLÍNIC

El principal tret clínic descrit en aquests pacients és la pèrdua de teixit adipós perifèric (lipoatròfia) a la cara (periorbital i temporal), braços, natges i cames, fent molt visibles i prominents les venes i musculatura de les cames. Aquesta pèrdua de greix perifèric pot anar acompanyada d'una acumulació de teixit adipós central a nivell intrabdominal i a més, en dones, als pits (lipohipertròfia).²⁷³ Alguns d'aquests pacients també poden presentar acumulacions de greix al coll i a la zona dorso-cervical donant lloc respectivament, a una doble barbata i al que es denomina gèpa de búfal (de l'anglès, “*buffalo hump*”), així com altres lipomes.²⁷⁴ Els nens, al igual que els adults, poden patir una redistribució del greix poc després de l'inici del tractament o bé, després d'un canvi d'aquest.

Paral·lelament a les alteracions fisiològiques, també es desenvolupen greus alteracions metabòliques. Molts pacients acaben desenvolupant resistència a la insulina (perifèrica i hepàtica), diabetis mellitus, hipertriglicèridèmia, baixos nivells de colesterol associats a HDL,²⁷⁵ alts nivells de colesterol associats a LDL, àcids grassos lliures incrementats, hiperglicèmia²⁷⁶ i esteatosi hepàtica.²⁷⁷ En relació als nivells d'adipoquines circulants, l'adiponectina es troba disminuïda en sèrum.²⁷⁸

Segons diferents estudis transversals de la població de pacients

tractats amb antiretrovirals, les estimacions de la prevalença d'aquesta síndrome varien entre un 30 i un 50%.^{275, 279} Un estudi prospectiu d'uns 18 mesos després de l'inici del tractament va resultar en una prevalença del 17%.²⁸⁰ L'aparició de lipodistròfia, i en concret la lipoatròfia, s'ha observat més freqüentment en pacients tractats amb anàlegs de nucleòsids (NRTIs) i inhibidors de proteasa (PI). Conseqüentment, el risc de patir la síndrome incrementa amb el temps de tractament, l'edat del pacient i el nivell d'immunodeficiència, i la composició del tractament també pot accentuar l'evolució de la simptomatologia lipodistròfica. Normalment, la pèrdua del teixit subcutani progressa de forma més ràpida en els pacients tractats amb NRTIs i PIs que en els que només reben NRTIs.

BASES PATOGENÈTIQUES

Les bases moleculars d'aquesta síndrome encara romanen sense identificar de manera concisa. Tot i així, sembla que hi hauria diferents mecanismes patofisiològics que actuarien de manera sinèrgica i complementària. És aquest aspecte el que fa que a vegades sigui complicat establir límits per descriure'ls. A grans trets es podrien dividir entre els que actuen a través de toxicitat mitocondrial, i els que no.

A. Toxicitat mitocondrial. Les disfuncions mitocondrials del teixit adipós de pacients sota tractament HAART van començar a ser objecte de recerca en plena època d'expansió i redefinició de les funcions de la mitocòndria dins de la fisiologia cel·lular. La mitocòndria ha deixat de ser un simple generador d'energia per passar a ser un dels components essencials en el control de processos clau, comprnent des de l'apoptosi a la producció de radicals lliures o espècies reactives d'oxigen (ROS). Així mateix, la investigació duta a terme dins del camp de la HALS ha contribuït a ressaltar la importància de la mitocòndria dins del teixit adipós.²⁸¹

Els avenços que ha suposat la HAART vers el SIDA són significatius, s'ha passat d'enfrontar-nos d'una malaltia letal a una malaltia crònica tractable. No obstant, la HALS i en concret la toxicitat mitocondrial, ha esdevingut una entitat clínica concomitant a aquest tractament.^{282, 283} Es caracteritza pels següents símptomes: disfunció cardíaca, fallida hepàtica, miopaties, acidosi làctica, replicació defectuosa del mtDNA, depleció del mtDNA i alteració de l'ultraestructura mitocondrial.²⁸⁴⁻²⁸⁸

A.1. Fosforilació d'NRTIs. Després de l'entrada a través dels transportadors de nucleòsids, els NRTIs han de ser fosforilats en tres passos a nivell citoplasmàtic o

mitocondrial. La timidina quinasa (TK) és un dels enzims que porta a terme aquestes fosforilacions, i és present tant a nivell citoplasmàtic (TK1) com mitocondrial (TK2). El fet que la seva presència relativa en cada tipus cel·lular variï, podria ser un dels determinants a que un teixit sigui més susceptible que un altre per desenvolupar toxicitat mitocondrial. Concretament, TK1 és present en aquells teixits que tenen un recanvi mitòtic més freqüent, i TK2 en teixits diferenciats.²⁸⁸⁻²⁹⁰ Aquest és un aspecte que podria ajudar a dilucidar els mecanismes pels que el greix visceral i subcutani tenen un comportament tan diferent, donant-se lipohipertròfia en el primer i lipoatròfia en el darrer, respectivament.²⁹¹ Tot i així, degut a les dificultats per obtenir biòpsies humanes, majoritàriament a nivell visceral, no hi ha dades disponibles que sustentin aquestes hipòtesis. No obstant, sí que hi ha treballs dins del context murí que assenyalarien diferències considerables de maquinària i/o susceptibilitat a la toxicitat mitocondrials entre les dues localitzacions.²⁹²

Tornant a l'activitat de la TK2 com a possible diana clau en el desenvolupament de toxicitat mitocondrial, en cultius cel·lulars, l'estavudina i la zidovudina han resultat ser repressors de la TK2.²⁹³ Això desestabilitzaria els acúmuls de deoxinucleòtids intramitocondrials i

afavoriria l'aparició de toxicitat mitocondrial. D'acord amb això hi ha dades que indiquen una millora dels nivells de greix subcutani en els pacients als quals s'ha suplementat dietàriament amb uridina.^{294, 295}

A.2. Inhibició de la DNA pol- γ . La polimerasa- γ és l'enzim encarregat de replicar el DNA mitocondrial. Es compon d'una subunitat principal que té activitat polimerasa i exonucleasa, i una altra de més petita que procura la unió al DNA.²⁹⁶ És aquesta activitat exonucleasa la que permet dur a terme una replicació del DNA amb garanties de fidelitat respecte el DNA motlle.²⁹⁷

Un cop dins de la mitocòndria, els NRTIs trifosfat establirien una competició per ser incorporats al mtDNA, i un cop dins, la falta del grup 3'-OH, provocaria l'estruncament de la síntesi de la cadena de mtDNA.^{298, 299} És aquesta mateixa falta del grup 3'-OH la que farà que l'NRTI sigui resistent a l'activitat exonucleasa de la DNA polimerasa- γ .³⁰⁰ Per últim, també es dona una inhibició de l'activitat exonucleasa a causa de l'acumulació intracel·lular de la forma monofosfat dels NRTIs.

Estudis transversals recents de població afectada han confirmat la depleció de mtDNA en el teixit adipós subcutani de pacients amb la HALS, respecte individus controls no infectats,^{301, 302} i també respecte

individus naïve (infectats i no tractats).^{301, 303, 304} Els agents farmacològics de la HAART als que s'acostuma a atribuir aquests efectes han estat l'estavudina i la didanosina (NRTIs). D'acord amb això, s'ha observat una millora de la quantitat de mtDNA quan es substitueix l'estavudina per altres NRTIs,³⁰⁵⁻³⁰⁷ o quan es passa d'un règim basat en NRTIs a un altre basat en inhibidors de proteasa.³⁰⁸ En concret, aquest últim canvi de tractament, també comporta una millora de la lipoatròfia incrementant moderadament la quantitat de teixit adipós subcutani^{306, 308} i disminuint l'apoptosi adipocitària.^{305, 306} Per altra banda, estudis longitudinals també indiquen que el tractament amb NRTIs (sobretot estavudina i zidovudina) provoca una depleció de mtDNA i una disminució de l'activitat citocrom oxidasa,^{307, 309} que millora quan s'atura el seu subministrament.³¹⁰

No obstant, estudis recents han aportat proves que l'alteració mitocondrial en els pacients HALS abasta processos molt més amplis que la depleció de DNA mitocondrial no només atribuïbles als NRTIs.

La reducció en l'expressió gènica dependent de mtDNA es pot trobar en pacients que no presenten depleció de mtDNA però que sí han estat tractats amb NRTIs.^{311, 312} Això per sí sol ja seria indicatiu que els NRTIs poden ser causa de disfunció

mitocondrial per altres vies diferents de la inhibició de la DNA pol- γ .

A.3. Depleció i mutació del mtDNA. El resultat de la inhibició de l'únic enzim del mtDNA, tant per sintetitzar noves cadenes de DNA com per reparar els errors de replicació introduïts, provocarà una depleció de mtDNA^{282, 285, 287} que comportarà una síntesi disminuïda de proteïnes essencials per la OXPHOS. Al seu torn, la disrupció de l'OXPHOS acabarà en una pèrdua d'energia (augment de la relació AMP/ATP), i l'alliberament d'electrons de la cadena respiratòria incrementant la producció de ROS.³¹³ Aquest augment de la concentració de ROS danyarà proteïnes, lípids i mtDNA, iniciant una cascada d'episodis perjudicials.

En estudis amb ratolins, l'efecte de la repressió de l'expressió de gens de l'OXPHOS en el teixit adipós visceral ha estat associada al guany de pes.³¹⁴ Aquest també seria un aspecte a tenir en compte de cara a explicar les diferències entre el greix subcutani i visceral.

A.4. Estrès oxidatiu. Estrès oxidatiu es defineix per un desequilibri entre la producció de ROS (p.ex. superòxid, peròxid d'hidrogen, radicals hidroxil i peroxinitrit) i els agents antioxidants de la cèl·lula.³¹⁵ Encara que la depleció d'energia per alteració de la replicació del mtDNA és una conseqüència lògica de la toxicitat

dels NRTIs, és raonable pensar que l'estrès oxidatiu també hi pren part.

La via mitjançant la que l'estrès oxidatiu podria obstaculitzar la replicació del mtDNA és l'oxidació de les seves cadenes. La mitocondria concentra ferro (Fe) per ser incorporat als citocroms i proteïnes no hemo-fèrriques incloent-hi enzims amb grups Fe-S com l'aconitasa. Els ROS poden alliberar el ferro Fe(II) de l'aconitasa,³¹⁶ i aquest unir-se al mtDNA donant lloc a un punt específic d'oxidació. Per altra banda, s'ha descrit que la DNA pol- γ és sensible al dany oxidatiu *in vitro*, cosa que podria ser d'importància *in vivo*.²⁸⁷

A.5. Apoptosi. Una de les característiques comunes al teixit adipós subcutani dels pacients HALS és l'apoptosi d'adipòcits i cèl·lules endotelials.³¹⁷⁻³¹⁹ Encara que la implicació de la mitocondria en les vies d'apoptosi és coneguda,^{303, 320} no està clar en quin punt específic de les vies d'apoptosi actua l'ART. Tot i així, s'han descrit alts nivells d'apoptosi conjuntament amb depleció de mtDNA en pacients tractats amb estavudina respecte individus control,³⁰⁶ així com també s'han observat millores en els nivells de mtDNA i apoptosi dels pacients tractats, quan a aquests se'ls canviava l'estavudina per altres NRTIs menys agressius com l'abacavir o la zidovudina.³⁰⁶ El conjunt d'aquestes dades apuntaria a que l'apoptosi

observada es derivaria dels efectes de toxicitat mitocondrial dels NRTIs.

No obstant, altres fàrmacs diferents dels NRTIs podrien estar intervenint en les vies d'apoptosi. S'ha descrit que el nelfinavir (i possiblement altres inhibidors de proteases) faciliten protecció contra l'apoptosi a través de la interacció directa amb el complex del porus de permeabilitat de transició mitocondrial (MPTP), component principal en el control de l'apoptosi dirigida per la mitocondria.³²¹ Encara que aquests estudis no han estat realitzats en el context de cèl·lules adiposes, aquestes dades no concordarien amb el rol proapoptòtic atorgat als inhibidors de proteasa associat a toxicitat mitocondrial.³²² No obstant, noves dades provinents del cultiu d'adipòcits indiquen que el nelfinavir promou l'apoptosi.³²³

Així doncs la importància de la mitocondria en els processos apoptòtics sembla ser prou important. En estudis de pacients amb la HALS s'ha identificat una morfologia mitocondrial alterada en els adipòcits que patien apoptosi.³²⁰ Per altra banda, la substitució dels fàrmacs del tractament antiretroviral que se sap que donen lloc a més toxicitat mitocondrial, s'ha vist que estaria associat a un increment de la massa de teixit adipós subcutani.³⁰⁶ En canvi, això no passa quan les variacions d'aquests fàrmacs només milloren el quadre metabòlic però no

modifiquen el grau de toxicitat mitocondrial (i d'apoptosi).³²⁴

Així doncs, aquests estudis donen consistència a la hipòtesi que les alteracions mitocondrials poden activar l'apoptosi en adipòcits, de la mateixa manera que ha estat descrit en altres tipus cel·lulars. De fet, una de les hipòtesis de com el dany mitocondrial podria portar a l'activació del catabolisme, implica l'activació de l'AMP-quinasa degut a un augment dels nivells d'AMP,²⁸¹ i recentment, s'ha vist que l'activació de l'AMP-quinasa és inductora de l'apoptosi.³²⁵ Altres factors que se sap que activen l'apoptosi al teixit adipós, ja sigui com a conseqüència de l'acció de la infecció o per la inducció de l'activitat de l'AMP-quinasa esmentada, són els nivells alts d'interferó γ (IFN- α).³²⁶ Finalment, un altre possible origen de l'activació de l'apoptosi a través de la mitocondria estaria relacionada amb la producció de ROS. De fet, estudis recents amb PIs han resultat en un augment de l'apoptosi en cultius d'adipòcits a causa de l'activació de l'estrès oxidatiu.³²⁷

A.6. Infecció de l'HIV-1. L'HIV per sí sol podria ser responsable de contribuir a l'estrès oxidatiu. L'expressió transgènica de Tat en cultius cel·lulars de neurones humanes i ratolins altera les defenses antioxidants: s'han observat canvis en el contingut cel·lular de glutatió i supressió de l'activitat superòxid

dismutasa,³²⁸ major susceptibilitat a la toxicitat per NRTIs³²⁹ i alteracions ultraestructurals de la mitocondria.³³⁰ En humans, Vpr pot activar components mitocondrials de la via d'apoptosi cel·lular com el MPTP,^{331, 332} i per tant, fer més sensible les cèl·lules a l'apoptosi mediada per toxicitat mitocondrial deguda a l'ART.

També en humans, hi ha dades que indiquen depleció de mtDNA i alteracions de la cadena respiratòria mitocondrial de cèl·lules PBMC (“*Peripheral Blood Mononuclear Cells*”)³³³ i greix subcutani de pacients infectats per l'HIV-1 no tractats.³³⁴ Cal dir que hi ha grups que no han detectat depleció de mtDNA al teixit subcutani de pacients naive.³⁰³

A.7. Procés inflamatori. El teixit adipós dels pacients HALS està immers en un ambient proinflamatori. Marcadors com el factor de necrosi tumoral α (TNF α), altres citokines proinflamatòries i la infiltració de macròfags constitueixen signes d'aquesta situació.³³⁵ Aquest fenomen podria agreujar l'impacte de la toxicitat mitocondrial mediada per l'ART ja que TNF α ha estat descrit com un repressor de l'expressió de proteïnes mitocondrials en adipòcits humans,³³⁶ i és sabut que és una citokina activadora de l'apoptosi mediada per la mitocondria.³³⁷

B. Inhibició de l'adipogènesi. Tot i desconeixent-se'n el mecanisme, s'ha descrit que

diferents fàrmacs dels tres grups que conformen la HAART podrien inhibir la diferenciació d'adipòcits, i d'aquesta manera, contribuir a la lipoatròfia.³³⁸⁻³⁴¹

Per una banda, aquests mecanismes actuarien mitjançant la repressió de gens adipogènics com C/EBP α (“*CCAAT/enhancer binding protein- α* ”) i PPAR γ ,³³⁸ així com la repressió del factor de transcripció adipogènic SREBP-1, que és un activador de gens que codifiquen per enzims lipogènics i enzims productors de lligands de PPAR γ .³⁴² D'acord a això, en cultius cel·lulars d'adipòcits s'ha descrit la inhibició de la translocació d'SREBP-1 al nucli³⁴³ i s'ha proposat que l'acumulació observada d'SREBP-1 en pacients HALS podria respondre a l'acumulació de la seva forma inactiva, donant lloc així a inhibició de l'adipogènesi i lipoatròfia.

Així doncs, la inhibició de la diferenciació adipocitària estaria impedit que els preadipòcits presents al teixit adipós poguessin adquirir el seu fenotip d'adipòcit madur, i així, suplir la depleció d'adipòcits en localitzacions on s'estan donant processos de lipòlisi i apoptosi associats a lipoatròfia. Cal dir que el tractament dels pacients HALS tractats amb fàrmacs que actuen sobre PPAR γ promovent diferenciació com les tiazolidinediones, no han tingut gaire èxit.³⁴⁴ Podria ser que el tractament *in*

in vivo no restauri completament la diferenciació o que la inhibició de la diferenciació jugui un paper més secundari en el desenvolupament de la HALS. Tot i així, la reducció en l'expressió de PPAR γ observada en pacients HALS³⁴⁵ podria contribuir a aquesta falta de sensibilitat a les tiazolidinediones.

C. Estat inflamatori. El desenvolupament de l'estat inflamatori en el teixit adipós sembla ser conseqüència de la complexa combinació de la infecció de l'HIV-1 i la HAART. En aquest procés, els adipòcits i cèl·lules presents al teixit adipós com els macròfags i cèl·lules endotelials, estan implicats com a efectors i com a dianes de la senyalització proinflamatòria. En el teixit adipós dels pacients amb HALS s'han trobat alts nivells d'expressió de TNF α , Interleuquines -1, -6, -8 i -18, i interferó- γ .³⁴⁶⁻³⁴⁸ Juntament amb els efectes de l'HIV-1 i les seves proteïnes virals, alguns NRTIs i PIs poden induir l'expressió de TNF α i Interleuquina-6 (IL-6) en cultius d'adipòcits.³⁴⁹ Per tant, es creu que la HAART contribuiria a l'alliberament de citocines a través dels adipòcits. A més, tant la infecció de l'HIV-1³⁵⁰ com l'acció de les seves proteïnes³⁵¹ és associada a l'activació de cèl·lules endotelials, com ho demostra l'augment de marcadors moleculars VCAM-1, Selectina-E i ICAM-1 en pacients HIV-1⁺.³⁵² De fet, Tat és capaç d'induir per sí mateixa

l'alliberament de la proteïna quimioattractant de monòcits 1 (MCP-1, o altrament coneguda com CCL-2) per part de les cèl·lules endotelials. En menor proporció, aquesta quimioquina també és produïda pels adipòcits, cosa que també ajudarà a reclutar macròfags.³⁵³ En la mateixa línia, es creu que la HAART també podria contribuir a canvis en les cèl·lules endotelials i el reclutament de macròfags incrementant l'alliberament d'MCP-1.³⁵¹ Aquest reclutament reforçaria la senyal proinflamatòria dins del teixit, i de fet, se sap que els macròfags activats alliberen citocines i MCP-1 en el teixit adipós.³⁵⁴ Molts d'aquests agents de senyalització actuen conjuntament per donar lloc a canvis dins del teixit adipós. De fet, Tat i TNF α , treballen sinèrgicament en la inducció de l'alliberament d'IL-6 per part de les cèl·lules endotelials,³⁵¹ mentre que alguns fàrmacs de la HAART potencien l'efecte apoptòtic de TNF α .³¹⁹ En general, s'esperaria que les citocines de diferents orígens cel·lulars presents al teixit adipós tindrien com a efecte la reducció d'aquest a través del seu efecte lipolític i de la resistència a insulina. El número de cèl·lules es reduiria per una combinació d'apoptosi i la impossibilitat de substituir aquestes cèl·lules a causa de la inhibició de la diferenciació adipocitària per acció de les citocines com TNF α i els

fàrmacs de la HAART. El resultat de tot això seria la lipoatròfia del teixit adipós subcutani.

D. Lipòlisi i alts nivells d'àcids grassos. Dins del quadre general d'hiperlipidèmia, la HALS s'associa a un augment del nivell circulant d'àcids grassos lliures (FFAs).³⁵⁵ Sembla ser que aquesta anomalia és deguda a una activació de la lipòlisi del teixit adipós, un fet esperable, tenint en compte la pèrdua progressiva de greix en les localitzacions lipoatròfiques. Per altra banda, aquests nivells incrementats de FFAs tenen com a conseqüència el desenvolupament de la resistència a insulina patent en la HALS, cosa que concordaria amb el fet que quan s'inhibeix la lipòlisi per via farmacològica, millora la sensibilitat vers la insulina.³⁵⁶

De manera semblant a com passa amb altres trets de la HALS, l'activació de la lipòlisi sembla ser deguda a una combinació de l'acció dels fàrmacs de la HALS i de la infecció del virus HIV-1 per sí mateix. De fet, l'estat augmentat de la lipòlisi ha estat descrit en pacients HIV-1⁺ independentment del tractament HAART.³⁵⁷ En aquesta línia, s'ha trobat que la família de fàrmacs antiretrovirals dels PIs activen la lipòlisi en cultius cel·lulars d'adipòcits,^{358, 359} i que, la suspensió de la seva administració redueix la lipòlisi i els nivells de FFAs en els pacients tractats.³⁶⁰ De la mateixa

manera, es creu que l'increment dels nivells de TNF α (i altres citoquines) en relació a la infecció de l'HIV-1 o al tractament podrien ser responsables de l'increment sostingut de la lipòlisi al teixit adipós, ja que TNF α , a l'igual que citoquines com IL-6,³⁶¹ activen la lipòlisi en els adipòcits. Aquest fet ha estat relacionat directament amb l'augment de l'alliberació d'àcids grassos en el teixit adipós dels pacients HALS.^{361, 362} Matitzant aquest punt, dades provinents del cultiu conjunt de macròfags i adipòcits indicarien que l'alliberament de FFAs per part dels adipòcits activa la secreció de TNF α en els macròfags.³⁶³

LIPODISTRÒFIA PARCIAL ADQUIRIDA (SÍNDROME BARRAQUER-SIMONS) QUADRE CLÍNIC

Abans de la identificació de la lipodistròfia associada als pacients afectats amb la síndrome de la immunodeficiència humana adquirida (SIDA), la lipodistròfia parcial adquirida,^{272, 364, 365} era la més freqüent dins del grup de les lipodistròfies adquirides. No obstant segueix sent una malaltia rara de la que només se n'han descrit uns 250 casos en tot el món.³⁶⁶ La proporció d'afectació entre homes i dones és de 1:4. La pèrdua de teixit adipós durant la infància i l'adolescència afecta la cara, coll, braços, tòrax i la part

superior de l'abdomen de manera cefalocaudal.⁶⁶ Per contra, es poden trobar acumulacions anormals de greix a les caderes i les cames, especialment en les dones. La resistència a la insulina i complicacions associades no acostumen a estar presents.³⁶⁶ En aproximadament el 20 per cent dels pacients es desenvolupa una glomerulonefritis mesangiocapil·lar (membrano-proliferativa) als vuit anys de l'inici de la lipodistròfia. Altres malalties autoimmunes, incloses el lupus eritematós i dermatitis juvenil, també han estat descrites en alguns d'aquests pacients.^{367, 368}

BASES PATOGÈNIQUES

La majoria dels pacients afectats per aquesta lipodistròfia tenen nivells normals de tots els factors del complement. No obstant, això no és així en el cas dels baixos nivells de C3 en sèrum i nivells circulants detectables d'una IgG autoimmune que actua sobre el factor nefrític C3. El factor nefrític C3 estabilitza la convertasa C3 (C3b,Bb), enzim que de per sí escindiria constitutivament el factor C3 i activaria la ruta alternativa del complement provocant un consum excessiu de C3.³⁶⁹ Per altra banda, els adipòcits estan implicats en la síntesi de factors del complement que són claus en la ruta d'activació del complement, per exemple, participant en la síntesi de C3b,Bb a través de la producció del

factor D (adipsina).³⁶⁹ Així doncs, la possible capacitat dels adipòcits per activar el complement via C3b,Bb a nivell de membrana provocaria la lisi dels adipòcits donant lloc a lipodistròfia.³⁷⁰ En qualsevol cas, per què el teixit adipós de les cames no queda afectat i, si aquest procés autoimmune podria ser desencadenat per una infecció vírica o no, no queda clar.^{371, 372}

LIPODISTRÒFIA GENERALITZADA ADQUIRIDA QUADRE CLÍNIC

Aquesta lipodistròfia ha estat diagnosticada en un 80 pacients (proporció home-dona, 1:3).³⁷³ La pèrdua de teixit adipós subcutani es dona durant la infància i l'adolescència, i afecta grans parts del cos com la cara, braços i cames. El greix de les mans i les plantes dels peus també pot arribar a perdre's, quan per contra, el teixit adipós retroorbital i del moll de l'os es conserva.³⁷³ El grau de pèrdua de teixit adipós intrabdominal és variable. Els nens afectats poden mostrar una gana desmesurada, així com també desenvolupen (en la seva majoria) acantosi nigricans i esteatosi hepàtica.³⁷⁴ En una cinquena part dels pacients ha estat descrita l'aparició de cirrosi com a seqüela de l'esteatosi hepàtica o hepatitis autoimmune. La majoria de pacients

tenen nivells baixos de leptina i adiponectina en sèrum.³⁷⁵

BASES PATOGENIQUES

L'inici de la lipodistròfia generalitzada adquirida s'anuncia amb un episodi d'aparició de nòduls inflamatoris subcutanis i paniculitis en un 25 per cent dels pacients.^{373, 376} La marca distintiva d'aquestes lesions és una infiltració del teixit adipós subcutani per histiòcits, limfòcits i cèl·lules gegants multinucleades, amb una reacció granulomatosa. Inicialment, aquestes lesions cicatritzen amb una pèrdua localitzada de greix, però més tard, quasi tot el teixit adipós subcutani desapareix per complet. Un altre 25 per cent dels pacients afectats pateixen malalties autoimmunes associades.^{373, 376} No obstant, la meitat del pacients afectats pateixen la variant idiopàtica de la malaltia, que no inclou ni paniculitis ni malalties autoimmunes i deixaria la porta oberta a altres mecanismes d'acció.³⁷³

LIPODISTRÒFIES LOCALITZADES

La majoria de gent amb lipodistròfies localitzades perd teixit adipós subcutani de petites àrees deixant petits solcs. Per contra, en altres casos grans regions del tronc o de les extremitats hi estan involucrades. La causa d'aquestes pèrdues de greix és variable i podria

estar relacionada a la injecció de fàrmacs com la insulina i corticosteroids, pressions recurrents, paniculitis o mecanismes desconeguts.³⁶⁶

LIPOATRÒFIA SEMICIRCULAR

El primer cas de lipoatròfia semicircular va ser descrit el 1974,³⁷⁷ i des de llavors, la incidència d'aquesta alteració ha estat ben baixa. Només recentment ha progressat una situació "epidèmica" afectant centenars d'individus que tenen en comú el fet de compartir un lloc de treball del tipus d'empleat administratiu.³⁷⁸

La patologia d'aquesta malaltia es caracteritza per l'aparició de depressions a la regió anterolateral de les cuixes. La pell adjacent a les zones afectades és normal, i no es presenten signes d'inflamació precedents a aquesta lesió. Tota aquesta simptomatologia és revertida quan el pacient deixa el seu ambient laboral durant cert període de temps (aproximadament uns 9 mesos).³⁷⁹

La base patogènica de la malaltia és desconeguda. Fins fa un temps, l'origen de la malaltia s'atribuïa a repetits microtraumes ocasionats per pressions d'aquestes extremitats contra el mobiliari de l'oficina a causa de l'adopció de certs hàbits posturals a l'hora de seure.^{380, 381} No obstant, no s'ha atorgat cap relació causal prou clara i hi ha casos

on no és possible associar-hi cap tipus de traumatisme. Recentment, també s'ha suggerit que els camps electromagnètics generats pels ordinadors, aparells electrònics i tot el seu sistema de cablejat podria modificar les propietats bioelèctriques de la pell. D'aquesta manera, això podria influenciar la biologia dels macròfags fent que aquests exhibissin una activitat lipofàgica a l'epidermis. S'ha proposat que aquesta electroactivació podria ser mitjançada per l'alliberament de $TNF\alpha$.³⁷⁸

Lipodistròfies Congènites

Totes les formes de lipodistròfies congènites són poc freqüents i difereixen en la seva forma d'expressió. Nous avanços en la comprensió de les bases moleculars de les lipodistròfies congènites de més incidència han ajudat a esclarir la patogènesi de símptomes i complicacions metabòliques associades.

LIPODISTRÒFIA GENERALITZADA (SÍNDROME BERARDINELLI-SEIP) QUADRE CLÍNIC

La lipodistròfia generalitzada congènita és una malaltia autosòmica

recessiva que ha estat descrita en uns 250 pacients de diferent origen ètnic.^{382, 383} Assumint que només 1 de cada 4 pacients és diagnosticat, la prevalença estimada a nivell mundial és d'1 cas per cada 10 milions. La característica principal és la quasi completa absència de teixit adipós en el moment del part i la conseqüent possibilitat de reconèixer tota la disposició del teixit muscular.

La primera infància es veu marcada per un creixement accelerat, una edat òssia avançada, i una gana desmesurada. Durant la segona infància, en el coll, aixelles, engonals i tronc, es desenvolupa una marcada acantosi nigricans. És també molt comuna l'aparició d'hepatomegàlia de fetge gras i la possibilitat que aquesta, finalment, pugui acabar derivant a cirrosi. Junt amb això, s'acostuma a presentar esplenomegàlia. Per altra banda, quasi tots els pacients presenten una prominència o hèrnia umbilical, i aparença acromegàlica consistent en una lleugera prominència mandibular, de les mans i dels peus. Després de la pubertat, en les noies, es pot desenvolupar clitoromegàlia i la síndrome de l'ovari policístic. Poques dones afectades poden portar a terme un embaràs amb èxit quan, per contra, tots els homes afectats són fèrtils. Alguns pacients pateixen cardiomiopaties hipertròfiques i retard mental lleu.^{384, 385}

A nivell metabòlic, la hiperinsulinèmia i l'hipertrigliceridèmia poden estar presents fins i tot a edats temperanes de la infància. Concretament, en el cas de nivells extrems d'hipertrigliceridèmia es poden arribar a presentar quadres de pancreatitis. La diabetis mellitus de tipus II acostuma a donar-se durant o a partir de l'adolescència, amb les corresponents complicacions que això comportarà a llarg termini. Paral·lelament, es troben nivells de leptina i adiponectina extremadament baixos.³⁸⁵⁻³⁸⁷

BASES MOLECULARS DE LA LIPODISTRÒFIA GENERALITZADA DE TIPUS I

Mitjançant la tècnica de clonació posicional es va trobar que els pacients d'aquesta variant de lipodistròfia presentaven mutacions per al gen de la 1-acilglicerol-3-fosfat-O-aciltransferasa 2 (AGPAT2). Aquest l'AGPAT2 està lligat al cromosoma 9q34 i en els pacients afectats es van trobar diferents mutacions homozigotes o combinacions heterozigotes per a aquest gen.^{386, 388}

Les 5 isoformes conegudes de l'AGPAT catalitzen l'acilació del glicerol-3-fosfat en la posició esteroespecífica número 2 durant la síntesi de triglicèrids i fosfolípids.^{389, 390} S'ha vist que l'expressió d'mRNA del gen AGPAT2 és, almenys, el doble

del que s'expressa AGPAT1 en el teixit adipós omental, però més baixa en el fetge i encara més reduïda en el múscul esquelètic.³⁸⁶ Aquestes observacions suggeririen que l'enzim AGPAT2 mutat seria el causant de la lipodistròfia mitjançant la reducció de la síntesi de triglicèrids, o disminuint la biodisponibilitat de l'àcid fosfatídic i fosfolípids que són components importants de la senyalització intracel·lular i de la membrana citoplasmàtica, respectivament.³⁹¹ D'aquesta manera, els pacients afectats anirien perdent el teixit adipós metabòlicament actiu en la majoria d'àrees subcutànies, les zones intraabdominal i intratoràcica, i la medulla espinal. Per contra, el teixit adipós mecànic que porta terme un paper de protecció i d'amortiment present en articulacions, òrbites, palmells i palmells plantars, cuir cabellut, perineu, vulva i la regió pericalícia dels ronyons sembla romandre intacta.³⁹²⁻³⁹⁴ La preservació d'aquest teixit adipós mecànic en pacients amb la isoforma AGPAT2 mutada podria explicar-se per l'augment d'expressió en altres AGPAT en aquestes localitzacions.

BASES MOLECULARS DE LA LIPODISTRÒFIA GENERALITZADA DE TIPUS II

El fet que, diferents mutacions del gen seipina en pacients lipodistròfics es van associar amb un anàlisi de lligament positiu al

cromosoma 11q13, va permetre establir un segon mecanisme pel qual es desenvoluparia aquesta variant de lipodistròfia.³⁹⁵ El gen de la seipina codifica per una proteïna de 398 aminoàcids de la que encara se'n desconeix la seva funció. No obstant, el fet que els pacients lipodistròfics tinguin uns nivells alts de l'expressió d'mRNA de la seipina en el teixit cerebral i febles al teixit adipós, fan pensar que el sistema nerviós hi estaria implicat. Això també lliga amb que la prevalença del retard mental moderat i la hipertròfia cardiomiopàtica que pateixen els pacients amb mutacions de la seipina és superior a la d'aquells que pateixen mutacions en el gen de l'AGPAT2.^{385, 386} Per contra, els pacients de tipus II perden tant el teixit adipós metabòlicament actiu com el teixit adipós mecànic.³⁹⁶

ALTRES TIPUS DE LIPODISTRÒFIA GENERALITZADA CONGÈNITA

Alguns pacients amb lipodistròfia generalitzada congènita (menys del 20%) no tenen mutacions ni mostren lligament al gen AGPAT2 o al gen de la seipina, respectivament. Això suggereix que altres loci i altres vies moleculars serien les desencadenants d'aquestes lipodistròfies.³⁹⁷⁻³⁹⁹

LIPODISTRÒFIA FAMILIAR PARCIAL DE DUNNIGAN QUADRE CLÍNIC

Les lipodistròfies familiars parcials són desordres heterogenis i autosòmics dominants amb diferents tipus de fenotips. En aquesta lipodistròfia, la distribució del teixit adipós no pateix cap alteració durant la infància. És a l'arribar la pubertat quan comença a manifestar-se un patró gradual de desaparició de greix als braços i les cames donant lloc a un aspecte muscular.⁴⁰⁰ Més tard, es dona una pèrdua variable i progressiva de teixit adipós de la part anterior de l'abdomen i, més tard, del pit.⁴⁰¹ Alguns dels pacients, les dones en particular, guanyen greix a la cara, coll i regió intraabdominal, donant lloc a una aparença semblant a la dels pacients que pateixen la síndrome de Cushing. L'acantosi nigricans i la síndrome de l'ovari policístic són símptomes poc comuns en aquest cas. Com veiem, el conjunt de totes aquestes característiques clíniques fa que el diagnòstic en el cas de les dones sigui una mica més fàcil que en el dels homes ja que aquests, poden presentar poc greix i prominència muscular degut a l'exercici. En qualsevol cas, una ressonància magnètica de cos complet revelarà la pèrdua de teixit adipós subcutani i un increment en la quantitat de greix intermuscular a braços i cames, així com també un excés d'aquest a nivell intraabdominal.⁴⁰¹

Diabetis, hipertrigliceridèmia, nivells baixos de colesterol HDL (“*High-Density Lipoprotein*”), i aterosclerosi són més prevalents en dones que en homes.⁴⁰² Normalment, la diabetis es desenvolupa després de la segona dècada de vida i va associada a un excés de greix en les zones no lipodistròfiques en les dones afectades.⁴⁰³ Així mateix, l’hipertrigliceridèmia ha estat associada a una pancreatitis aguda.⁴⁰⁴

BASES MOLECULARS

El fet d’haver trobat un locus (al cromosoma 1q21-22) lligat a la lipodistròfia familiar parcial de Dunnigan va portar a la identificació d’una mutació *missense* al gen que codifica per a la làmina A i C (LMNA).⁴⁰⁵ Al llarg del temps s’han anat trobant altres mutacions *missense* en aquest gen.^{403, 406-409}

Les làmines pertanyen a la família de proteïnes dels filaments intermedis que conformen la làmina nuclear. S’organitzen en una estructura polimèrica que s’intercala entre la cromatina i la membrana interna de la membrana nuclear. El gen LMNA conté 12 exons i codifica per ambdues làmines, A i C, mitjançant splicing alternatiu.^{410, 411} Les làmines nuclears proporcionen estabilitat estructural a l’embolcall nuclear i interactuen amb la cromatina i moltes altres proteïnes.⁴¹²

La pèrdua d’adipòcits associada a les mutacions de LMNA són, molt

probablement, degudes a una disrupció nuclear que donarà lloc a un procés apoptòtic o a una disrupció de la interacció entre làmines i factors de transcripció com SREBP1c.⁴¹³ Els fibroblasts dels pacients amb la lipodistròfia familiar parcial de Dunnigan tenen nuclis amb formacions protuberants i una desorganització de tota la malla que constitueix la làmina nuclear.⁴¹⁴ En qualsevol cas, els mecanismes que determinen la pèrdua de teixit adipós segueixen sent desconeguts, ja que no s’han trobat diferències d’expressió de cap de les làmines A o C als adipòcits de les regions subcutànies, omental o del coll.⁴¹⁵

S’ha vist que el canvi específic de les mutacions *missense* influeix sobre el fenotip final.^{409, 416} Aproximadament tres quartes parts dels pacients tenen substituïda l’arginina de la posició 482 per una glutamina, leucina o triptòfan, donant lloc a una miopatia moderada.^{403, 416} En la resta de pacients, segons la mutació, es desenvolupen diferents distròfies musculars i cardiomiopaties. Així doncs, aquestes mutacions causarien una distròfia multisistèmica on, l’edat d’inici i la severitat d’aquestes, diferirien en funció del residu aminoacídic mutat.⁴⁰⁹ Per altra banda, les interaccions de certs dominis de les làmines A i C amb altres proteïnes de la membrana nuclear (expressades segons el teixit),

determinarien les anomalies específiques de cada teixit.

LIPODISTRÒFIA FAMILIAR PARCIAL ASSOCIADA A MUTACIONS DE PPAR γ

QUADRE CLÍNIC

Existeixen alguns casos on mutacions heterozigòtiques del gen PPAR γ resulten en un fenotip semblant a la lipodistròfia familiar parcial de Dunnigan. El teixit adipós es veu reduït en extremitats i natges tot i que no se'n veu afectat en el greix subcutani abdominal. També es desenvolupa una resistència a la insulina greu, diabetis mellitus, dislipidèmia amb nivells alts de triglicèrids i HDL disminuïts, i hipertensió greu. L'esteatosi hepàtica i la síndrome de l'ovari policístic són presents freqüentment.⁴¹⁷

BASES MOLECULARS

La proteïna PPAR γ és un factor de transcripció dependent d'activació per lligand que s'expressa en grans quantitats al teixit adipós. Juga un paper essencial en la funció de la majoria dels gens específics d'aquest teixit i de l'adipogènesi.^{152, 342}

Se n'han descrit cinc mutacions: Cys190S, Arg397Cys, Pro467Leu, Val290Met i Phe388Leu. La mutació Cys190S provoca una alteració en l'estructura dels dits de zinc2 mitjançant el que PPAR γ s'uneix al DNA.⁴¹⁸ En el cas de la mutació

Arg397Cys, es produeix la ruptura d'un enllaç iònic entre la posició 397 i 324. Les altres tres isoformes mutants de PPAR γ han resultat ser transcripcionalment inviàbles, tenir reduïda la capacitat d'unió a lligand i inhibir l'acció de les isoformes normals que es coexpressen (efecte dominant negatiu).^{417, 419, 420} Veiem doncs que encara que les mutacions al gen PPAR γ causarien lipodistròfia a través de la inhibició adipocitària, les raons de la pèrdua de teixit adipós subcutani perifèric romanen poc clares.

LIPODISTRÒFIA ASSOCIADA A LA DISPLÀSIA MANDIBULOACRAL

QUADRE CLÍNIC

Aquest desordre és autosòmic recessiu i es caracteritza per presentar una hipoplàsia mandibular i clavicular, acroosteòlisi, contractures a les articulacions, pigmentació cutània puntejada, cares semblants a ocells, malformacions dentals, atròfia de la pell, calvície i lipodistròfia. Els pacients afectats poden presentar dos tipus de lipodistròfia: el tipus A inclou la pèrdua de teixit subcutani de braços i cames, i manté o incrementa en excés el greix a la cara i el coll; el tipus B es caracteritza per una pèrdua generalitzada de greix subcutani.⁴²¹ La hiperinsulinèmia, resistència a la insulina, diabetis mellitus i hiperlipidèmia són trets que es donen en alguns dels pacients.^{421, 422}

BASES MOLECULARS

Alguns pacients d'aquest desordre amb lipodistròfia de tipus A presenten la mutació Arg527His en el gen LMNA.^{396, 423} Per altra banda, també s'ha trobat una mutació en una metal·loproteïna (ZMPSTE24) implicada en el processat post-traduccional de la prelàmina A.⁴²⁴ Tot i així, hi ha pacients que no semblen presentar mutacions ni en ZMPSTE24 ni en LMNA, indicant l'existència d'altres loci sense identificar.⁴²⁴

Altres Afeccions de la Distribució del Teixit Adipós

LIPOMATOSI ASSOCIADA A LA HALS

QUADRE CLÍNIC

Aquesta alteració del teixit adipós és un símptoma que apareix en un subgrup de pacients de la HALS i també rep la denominació de “gepa de búfal”. Es caracteritza per una acumulació de teixit adipós subcutani progressiva a nivell de la regió dorso-cervical,^{425, 426} i tot i la semblança amb la hipertròfia visceral, es diferencia d'ella perquè només afecta a una regió anatòmica molt específica.

Els adipòcits de les “gepes de búfal” presenten una mida més reduïda i un patró heterogeni de distribució de les vacuoles lipídiques que varia des de multivacuolar a univacuolar.⁴²⁷ Per altra banda, són cèl·lules que han adquirit una capacitat proliferativa que roman intacta inclòs quan són transplantades a un ambient lipoatròfic.⁴²⁸ Aquest últim aspecte deriva de dades provinents de cirurgia plàstica reconstructiva aplicada als pacients HALS: el transplant de teixit adipós provinent de “gepes de búfal” en la zona facial lipoatròfica ha resultat en l'aparició de la “síndrome del hámster”, un creixement desmesurat del teixit adipós de les galtes com a conseqüència del transplant.⁴²⁸

Un altre aspecte diferencial d'aquest teixit proliferatiu és l'expressió d'UCP1, el marcador molecular diferencial del teixit adipós marró respecte el teixit adipós blanc.⁴²⁹ Això, juntament a l'aspecte morfològic prèviament esmentat, suggeriria l'adquisició de característiques pròpies del teixit adipós marró.

BASES PATOGÈNIQUES

Encara que l'etiopatogènesi d'aquest símptoma de la HALS és desconegut, l'existència d'un fenomen similar de lipomatosis dorso-cervical i expressió d'UCP1 en pacients portadors de mutacions del mtDNA,

⁴³⁰ abogarien per un cas comú de toxicitat mitocondrial com a origen de la patologia.⁴³¹ No obstant, de quina manera aquesta alteració mitocondrial provocada pels fàrmacs deriva en lipoatròfia o lipomatosi en algunes localitzacions anatòmiques, és desconegut ja que cap fàrmac de la HAART ha estat associat específicament a l'aparició de lipomatosi.⁴³² El que sí s'ha trobat és que alguns NRTIs com l'estavudina poden ser causants de la inducció de l'expressió d'UCP1, segurament simulant les vies dependents d'àcid retinoic en el control d'aquest gen.⁴³³

Tot i que el teixit adipós marró no és present en humans (almenys en quantitats importants), dins del teixit adipós blanc, com ja s'ha comentat, mitjançant tècniques de “*Real Time*” PCR s'ha detectat la presència de cèl·lules aïllades amb capacitat d'expressar UCP1.^{268, 269} En aquesta línia, hi ha indicis que en pacients amb resistència a la insulina es dona la inhibició de l'expressió de gens que codifiquen per a marcadors moleculars del teixit adipós marró,⁴³⁴ i també, s'ha observat que el tractament amb tiazolidinediones afavoreix l'adquisició de característiques de teixit adipós marró per part del teixit adipós blanc (veure secció TAM).⁴³⁵⁻⁴³⁷

LIPOMATOSI ASSOCIADA A MERRF

Tot i la diversitat de mutacions puntuals en el mtDNA, la lipomatosi només sembla estar present en aquells pacients portadors de la mutació tRNA^{Lys}, ja sigui la A8344G o la G8363A.⁴³⁸⁻⁴⁴¹ La presència de lipomes d'herència materna acompanyada de símptomes d'alteració neurològica és un indicatiu inequívoc de la presència d'aquestes mutacions tRNA^{Lys}. Altres mutacions patogèniques del mtDNA, també poden portar associades alteracions neurològiques, però mai lipomatosi. No se sap com les mutacions tRNA^{Lys} provoquen aquesta alteració específica del teixit adipós en aquests pacients.

Les alteracions cel·lulars i moleculars del teixit lipomatós dels pacients portadors de la mutació tRNA^{Lys} són poc coneguts. Tot i així, l'anàlisi de la ultraestructura d'alguns lipomes ha mostrat anomalies mitocondrials en forma d'inclusions electrodenss,⁴⁴² i en un lipoma d'un pacient amb la mutació A8344G es va trobar expressió del marcador específic de teixit adipós marró (UCP1).⁴³⁰

OBJECTIUS

OBJECTIUS

Objectiu Central

Per tal d'avançar en el coneixement de les causes moleculars de la lipodistròfia en pacients HIV-1, l'objectiu central d'aquesta Tesi ha estat estudiar les alteracions d'expressió gènica que apareixen en el teixit adipós subcutani de pacients infectats per HIV-1, subjectes a tractament HAART i que acaben desenvolupant lipodistròfia. A més, de forma complementaria, s'han realitzat estudis en paral·lel en el teixit adipós de pacients amb formes poc freqüents de lipodistròfies d'origen congènit o adquirit i amb característiques semblants a algunes de les alteracions de la lipodistròfia associada a HIV-1 ("gepa de búfal" en pacients amb mutacions del gen tRNA^{Lys} del DNA mitocondrial, i lipoatròfia perifèrica en una pacient amb la síndrome Barraquer-Simons).

Objectius Específics

1. Estudiar les alteracions en l'expressió gènica al teixit adipós subcutani de pacients infectats per l'HIV-1 en diferents estadis del tractament HAART i d'aparició de lipodistròfia, mitjançant RT-PCR quantitativa, immunoblot i anàlisi transcriptòmica.
2. Estudiar les alteracions específiques en l'expressió gènica del teixit adipós a la "gepa de búfal" que apareix en pacients HIV-1 sota tractament HAART, així com en pacients amb mutacions del gen tRNA^{Lys} al DNA mitocondrial.
3. Estudiar les alteracions en l'expressió gènica en el teixit adipós subcutani d'una pacient amb síndrome de lipodistròfia parcial adquirida (síndrome Barraquer-Simons).

RESULTATS

**La infecció de l'HIV-1 altera l'expressió gènica
del teixit adipós i contribueix a la lipodistròfia
associada a HIV-1/HAART**

REVISTA:

ANTIVIRAL THERAPY

2006 11(6): 729-40

PMID: 17310817

Resum:

Les bases etiopatogèniques de la lipodistròfia associada a l'HIV-1 i la HAART són poc conegudes, però aquesta síndrome indica que el teixit adipós és molt sensible, tant a la infecció de l'HIV-1, com als fàrmacs antiretrovirals i, possiblement, a la combinació de tots dos factors.

Per tal de discernir entre la contribució relativa de fàrmacs i la infecció, es va comparar l'expressió de gens marcadors de la funció mitocondrial, gens de la diferenciació i el metabolisme adipocitari, i gens d'adipoquines en el teixit adipós subcutani. Així mateix, aquest estudi es va portar a terme en els següents grups de pacients: individus sans, pacients infectats per l'HIV-1 encara no tractats, i pacients infectats per l'HIV-1 tractats amb o sense la HALS.

El teixit adipós subcutani dels pacients infectats, comparat amb el dels controls, va mostrar nivells baixos d'mRNA del gen de la citocrom oxidasa II codificat pel DNA mitocondrial. Aquestes concentracions encara eren més baixes associades al tractament HAART. De la mateixa manera, en els pacients infectats per l'HIV-1 (tractats o no), respecte els pacients controls, es va trobar una expressió reduïda de gens nuclears que codifiquen per proteïnes mitocondrials, PPAR γ , i marcadors específics de l'adipòcit. Per contra, el nivell d'expressió d'mRNA d'UCP-3 i Pref-1 incrementen en els pacients tractats lipodistròfics. Els gens que codifiquen per adipoquines, també estaven altament afectats: TNF α estava induït, mentre que l'adiponectina i la leptina estaven reprimits en els pacients infectats per l'HIV-1 (tractats o no). Així doncs, ja entre pacients naive i controls, es trobaven les principals alteracions de l'expressió gènica d'aquests marcadors. Altres canvis anaven associats a la HAART i al diagnòstic de la HALS.

Així doncs, les alteracions de l'expressió gènica en el teixit adipós ja serien presents en aquells pacients infectats pel virus de l'HIV-1 però sense tractament HAART. Conseqüentment, la infecció de l'HIV-1 per sí sola, provocaria part de les alteracions del teixit adipós que acabarien empitjorant a causa de la HAART, i al seu torn, desenvolupant la HALS.

**Alteració de l'expressió gènica dels
transportadors de nucleòsids (SLC28 i SLC29)
en el teixit adipós de pacients infectats per
l'HIV-1**

REVISTA:
ANTIVIRAL THERAPY
2007; 12(6): 853-63.
PMID: - 17926640

Resum:

Els transportadors de nucleòsids (NTs) són proteïnes codificades pels membres de les famílies gèniques SLC28 i SLC29. Aquests transportadors participen a les rutes de salvament i reciclatge de nucleòsids i nucleobases, així com també contribueixen a la modulació dels nivells extracel·lulars de l'adenosina i tots aquells elements als que aquesta regula. En aquest treball hem estudiat els patrons d'expressió dels gens que codifiquen pels NTs dins del context del teixit adipós, i si els seus nivells d'mRNA varien segons la infecció de l'HIV-1, la HAART o el desenvolupament de la HALS.

Els adipòcits humans expressen els gens SLC28A1, SLC28A2 i SLC28A3 (que codifiquen per hCNT1, hCNT2 i hCNT3, respectivament) i SLC29A1 i SLC29A2 (que codifiquen per hENT1 i hENT2, respectivament). Així mateix, la infecció de l'HIV-1, en l'estadi previ al tractament HAART i el desenvolupament de la HALS, s'associa amb la inducció dels nivells d'mRNA dels gens que codifiquen per hCNT1, hCNT3 i hENT2. De fet, l'increment d'mRNA dels dos primers gens, podria ser deguda a l'acció de $TNF\alpha$. El desenvolupament de la HALS s'associa a una inducció selectiva de l'mRNA d'hCNT2. Aquestes dades doncs, suggereixen que els gens de les famílies SLC28 i SLC29, no només serien dianes de la infecció de l'HIV-1, sinó que també contribuïrien al desenvolupament de les alteracions del teixit adipós subcutani que provoquen lipodistròfia.

Aproximació transcriptòmica a la lipodistròfia associada a HIV. Alteracions seqüencials en l'expressió de gens implicats en inflamació i metabolisme oxidatiu en el teixit adipós donen lloc a l'aparició d'aquesta síndrome

REVISTA:

AIDS (Research Letters)

2007 - ENVIAT

PMID: -

Resum:

Amb la intenció de discernir els principals mecanismes que porten al desenvolupament de la síndrome lipodistròfica en els pacients infectats per l'HIV-1 en tractament HAART, es van estudiar quatre grups de pacients: controls sans, pacients infectats per l'HIV no tractats (o naive), pacients infectats per l'HIV-1 sota tractament HAART sense signes de lipodistròfia, i pacients amb un quadre lipodistròfic plenament desenvolupat, incloent-hi lipoatròfia. Es va treballar amb l'RNA de les biòpsies de teixit adipós subcutani obtingudes de 24 pacients, i l'anàlisi transcriptòmica de l'expressió d'mRNA es va portar a terme mitjançant l'ús de dues mostres per grup de pacients, composta cadascuna d'elles de tres mostres d'RNA de tres pacients diferents.

Com a eina experimental es van fer servir els xips de DNA "Human Genome Survey" d'Applied Biosystems (AB): 31.700 sondes d'oligonucleòtids (60-mers) que representen un conjunt de 27.868 gens i més de 1.000 sondes control. Es va obtenir i amplificar el cRNA marcat amb Digoxigenina-UTP a partir d'1 microgram d'RNA total, i després de l'hibridació, es va mesurar i analitzar la senyal de quimioluminiscència generada. El programari d'AB es va fer servir per processar la senyal d'interès respecte el soroll de fons, i després d'obtenir els valors dels ràtios, se'ls va aplicar una transformació logarítmica i una normalització per quantils. L'anàlisi estadística de les diferències es va realitzar mitjançant tests estadístics binomials i tests de suma de rangs Wilcoxon. L'anàlisi d'expressió diferencial dels transcrits gènics en relació a la seva funció molecular, procés biològic i via metabòlica es va dur a terme mitjançant l'eina ontològica PANTHER. Els nivells d'expressió gènica representatius dels grups de gens més alterats es van validar a través dels "Gene TaqMan Expression Assays" d'AB.

Els resultats indicarien que la infecció en absència de tractament està associada a importants modificacions de l'expressió gènica en grups de gens pertanyents a la inflamació, la immunitat mitjançada per limfòcits-T i la immunitat associada a interferó. Els gens relacionats amb l'oxidació d'àcids grassos també mostraven alteracions en pacients naive. Tots aquests grups de gens seguien igualment alterats en els pacients sota tractament HAART no lipodistròfics, no obstant, van aparèixer modificacions específiques a nivell dels gens d'immunitat mitjançada per macròfags i destoxificació. A més, per primer cop i associat al tractament, es va detectar una alteració en l'expressió de gens de la fosforilació oxidativa mitocondrial i de gens del transport d'electrons. Aquestes alteracions es trobaven de manera molt més marcada als pacients tractats lipodistròfics. Més encara, les biòpsies de teixit adipós dels pacients lipodistròfics eren les úniques que presentaven alteracions en l'expressió dels

gens relacionats amb apoptosi, i per altra banda, presentaven una inducció dels gens del catabolisme dels àcids grassos.

A partir d'aquestes dades es proposa un patró de modificacions de l'expressió gènica que aniria evolucionant amb la progressió del desenvolupament de la lipodistròfia associada a HAART/HIV-1. En un primer estadi, la infecció de l'HIV-1 provocaria el desenvolupament d'un estat inflamatori. A continuació i com a conseqüència del tractament HAART, es produïria una greu alteració de l'expressió dels gens relacionats amb el metabolisme oxidatiu. Finalment, el conjunt de tot aquest procés seria empitjorat en els casos d'exposició perllongada al tractament HAART incloent-hi l'activació d'apoptosi i el desenvolupament de lipoatròfia del teixit adipós perifèric.

**L'anàlisi diferencial de l'expressió gènica
indica que les "gepes de búfal" són una
alteració particular del teixit adipós dins de la
lipodistròfia associada a HAART**

REVISTA:

AIDS

2007 - ACCEPTAT

PMID: -

Resum:

L'aparició d'un augment progressiu del teixit adipós de la zona dorso-cervical (anomenada "gepa de búfal") és una característica específica dels pacients de la lipodistròfia associada a la infecció per HIV-1/tractament HAART. Les bases moleculars d'aquesta alteració, totalment oposada a la lipoatròfia del teixit adipós subcutani, són desconegudes.

En aquest estudi es va determinar l'expressió gènica de marcadors de la funció mitocondrial, diferenciació adipocitària, inflamació i proliferació cel·lular a les gebes de búfal, i al teixit adipós subcutani de controls sans i pacients infectats per l'HIV-1 sota tractament HAART.

Al teixit adipós de les gebes de búfal, respecte el teixit adipós subcutani dels controls, s'han detectat baixes concentracions de DNA mitocondrial i d'aquells transcrits codificats pel DNA mitocondrial. L'expressió d'UCP1 només es va detectar al teixit adipós de les gebes de búfal, mentre que l'expressió d'UCP2 i UCP3, va romandre sense canvis per contra del que passava amb les mostres de teixit adipós subcutani. De la mateixa manera, l'expressió gènica dels marcadors d'adipogènesi no estava alterada als pacients amb gebes de búfal, mentre que estava profundament alterada al teixit adipós subcutani. A més, el teixit adipós de les gebes de búfal no mostrava la inducció de TNF α ni de β -2 Microglobulina com passa al greix subcutani dels demés pacients. L'expressió del marcador de macròfags CD68 estava disminuïda a les gebes de búfal respecte el teixit adipós subcutani dels pacients. Per contra, el marcador de proliferació PCNA va mostrar nivells d'expressió molt més alts a les gebes de búfal que al teixit subcutani dels pacients tractats i als controls sans.

El teixit adipós de les gebes de búfal, respecte el teixit adipós subcutani no lipomatós dels pacients HIV-1⁺ sota tractament HAART, sembla que presentaria alteracions específiques en l'expressió gènica dels seus marcadors. Per altra banda, les alteracions mitocondrials no poden explicar el comportament lipoatròfic diferencial del teixit adipós subcutani respecte el de les gebes de búfal, mentre que l'absència d'un estat inflamatori a les gebes de búfal podria explicar part de les diferències de comportament d'aquesta regió del teixit adipós.

**Alteració de l'expressió de gens reguladors de
l'adipogènesi en lipomes de pacients portadors
de mutacions puntuals en el gen de la tRNA^{Lys}
del DNA mitocondrial**

REVISTA:

MOLECULAR GENETICS AND METABOLISM

2006 Nov; 89(3): 283-5. Epub 2006, Apr 17

PMID: 16603396

Resum:

Els mecanismes subjacents a l'aparició de lipomes en pacients portadors de la mutació tRNA^{Lys} són desconeguts. S'han investigat els canvis en els patrons d'expressió gènica dels lipomes de tres pacients portadors de les mutacions de la tRNA^{Lys} A8344G o G8363A. Per contra del que passava a les mostres de teixit adipós subcutani, als lipomes, es va detectar expressió de l'mRNA de la proteïna desacoblant 1. No obstant, l'expressió d'altres marcadors del teixit adipós marró com PGC-1 α no estaven alterats. L'expressió gènica de PPAR γ i el retinoblastoma estaven reprimides als lipomes, tot i que la de C/EBP α no es va veure afectada. L'expressió de Pref-1 també es va trobar fortament reprimida. Així doncs, la lipomatosi deguda a les mutacions de la tRNA^{Lys} és associada al patró d'expressió alterat de gens clau en la regulació de l'adipogènesi. Això és consistent amb el fet que hi ha una activació de la proliferació i un teixit adipós amb un patró distorsionat entre blanc i marró.

**L'anàlisi de l'expressió gènica mostra
alteracions de la mitocondriogènesi i
l'adipogènesi al teixit adipós d'un pacient amb
lipodistròfia parcial adquirida (síndrome
Barraquer-Simons)**

REVISTA:

JOURNAL OF MEDICAL CASE REPORTS

2008 - ENVIAT

PMID: -

Resum:

La lipodistròfia parcial adquirida o la síndrome Barraquer-Simons (APL) és una forma rara de lipodistròfia progressiva que es caracteritza per l'atròfia del teixit adipós d'aquests pacients. L'etiopatogènesi d'aquesta síndrome és desconeguda, i per tal d'aprofundir en el seu coneixement, es va estudiar l'expressió gènica del teixit adipós d'una pacient recentment diagnosticada.

L'expressió gènica de marcadors de l'adipogènesi i el metabolisme adipocitari, incloent-hi el regulador PPAR γ , estava reprimida a la pacient APL. Els nivells d'expressió de l'adiponectina també estaven reprimits, però per contra, els de la leptina no mostraven cap canvi. Així mateix, els marcadors locals de l'estat inflamatori tampoc estaven alterats. Per altra banda, l'expressió dels gens relacionats amb la funció mitocondrial estava reduïda, tot i que els nivells de DNA mitocondrial van romandre inalterats.

Aquests resultats apunten a una alteració de l'expressió de gens relacionats amb l'adipogènesi i la mitocondriogènesi del teixit adipós de la pacient APL.

ANEX DE RESULTATS

ANEX DE RESULTATS

Efectes de TNF α sobre l'expressió gènica de cèl·lules adiposes en cultiu

(Dades no sotmeses a publicació)

INTRODUCCIÓ

L'augment en els nivells de TNF α al teixit adipós observats com uns dels primers esdeveniments ja associats a la infecció per HIV-1 feien pensar que podria ser el TNF α un agent causal primordial en donar lloc al conjunt d'alteracions en el teixit adipós en els pacients amb HALS, tal i com es proposa en l'esquema final de l'article 1. Aquesta mateixa hipòtesi es va fer en relació a les alteracions en l'expressió gènica dels transportadors de nucleòsids en pacients amb HALS (article 2). Per tal d'avançar en respondre a aquesta pregunta es varen realitzar experiments en que cèl·lules adiposes humanes en cultiu foren tractades amb TNF α i es determinà els canvis en l'expressió dels gens per a aquests transportadors (article 2).

Aquesta mateixa aproximació podia ser emprada en relació als gens marcadors de biogènesi mitocondrial

i adipogènesi estudiats en l'article 1. Amb aquesta finalitat es determinà com l'exposició a 10 nM TNF α afectava l'expressió d'aquests gens mitjançant RT-PCR quantitativa i emprant la mateixa metodologia que en els articles 1 i 2, excepte per a la determinació del transcrit codificat pel DNA mitocondrial, en que s'emprà el transcrit per la subunitat II del complex I o NADH-deshidrogenasa, ND2 (Hs00846374_s1).

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Tal i com es pot comprovar, el TNF α provoca una disminució generalitzada de l'expressió gènica de marcadors del metabolisme de l'adipocit, com LPL i GLUT4, així com de l'adiponectina i, en menor grau de la leptina (Fig 1). Aquests resultats son força paral·lels als observats en teixit adipós de pacients amb HALS i fins i tot en pacients

“naive” en els que ja és present l’augment de $\text{TNF}\alpha$. En base al coneixement existent de la regulació transcripcional dels gens esmentats, podria ser que els efectes del $\text{TNF}\alpha$ es produïssin de forma indirecta, degut a la potencial acció d’aquest sobre els reguladors adipogènics clau ($\text{PPAR}\gamma$ i $\text{C/EBP}\alpha$) que controlen l’expressió de gens del metabolisme lipídic adipocitari i d’adipoquines com l’adiponectina o la leptina (*Spiegelman et al., 1993*). Efectivament, els nostres resultats indicaren que el $\text{TNF}\alpha$ reduïa significativament l’expressió de $\text{PPAR}\gamma$ i de $\text{C/EBP}\alpha$, en major grau en aquest darrer cas. Aquest resultat, tot i concordar també amb l’observat en el teixit adipós de pacients HIV, mostra un cert grau de diferència ja que en les biòpsies de teixit adipós és el transcrit de $\text{PPAR}\gamma$ el més reduït mentre que $\text{C/EBP}\alpha$ mRNA es troba poc disminuït. En qualsevol cas, i en concordança amb dades ja conegudes (*Warne, 2003*), $\text{TNF}\alpha$ actua com un agent repressor de gens implicats en la diferenciació i el metabolisme adipocitari en les cèl·lules adiposes humanes.

Pel que fa als gens implicats en la funció mitocondrial (Fig 2), mentre que en pacients hi hagué una reducció paral·lela dels transcrits corresponents a subunitats de la cadena respiratòria codificats pel DNA mitocondrial i pel DNA nuclear ja en pacients “naive”, només el

codificat per DNA mitocondrial (ND2) estigué reduït com a conseqüència de l’acció del $\text{TNF}\alpha$. És remarcable que, mentre que el regulador mitocondriogènic NRF1 no estigué afectat per $\text{TNF}\alpha$, igualment com no ho està en teixit adipós de pacients, $\text{PGC-1}\alpha$ estigué profundament disminuït en resposta a $\text{TNF}\alpha$. Això fou totalment diferent amb el que s’observà en teixit adipós de pacients. A més, aquesta reducció en $\text{PGC-1}\alpha$ no tingué com a conseqüència cap reducció en els seus gens diana mitocondrials, com COIV tot i que sí que fou paral·lela a una reducció en UCP2 (veure més endavant), diana també de $\text{PGC-1}\alpha$. Es coneix molt poc dels efectes del $\text{TNF}\alpha$ sobre la expressió gènica mitocondrial a cèl·lula adiposa humana. Dades recents (*Dahlman et al., 2006*) indiquen un descens moderat de l’expressió d’alguns gens codificants per components de cadena respiratòria mitocondrial i una manca d’efectes sobre reguladors com NRF2 però l’explicació del comportament diferencial pel que fa a l’expressió del mRNA de $\text{PGC-1}\alpha$ en teixit de pacients i en cèl·lules adiposes exposades a $\text{TNF}\alpha$ farà necessàries noves aproximacions experimentals.

En darrer lloc, cal esmentar el comportament oposat de UCP2 i UCP3 en resposta a $\text{TNF}\alpha$. UCP2 mRNA es troba reduït, de forma

semblant al que s'esdevé en pacients HIV-1, fins i tot en l'estat de "naïve". UCP3 mRNA es veu augmentat, la qual cosa estaria d'acord amb el que s'observa en els pacients només en el cas dels que mostren ja lipodistrofia. L'augment de UCP3 mRNA en pacients l'havíem atribuït a la activitat lipolítica en el teixit adipós d'aquest pacients, donada la acció estimuladora dels àcids grassos lliures sobre el gen UCP3 (*Solanes et al., 2003*). Vistos aquests resultats, podria ser que fos la coneguda acció pro-lipolítica del TNF α en adipòcits (*Gasic et al., 1999*) la responsable de la inducció de l'expressió del gen UCP3, tot i no poder-se excloure una acció del TNF α independent de lipolisi. De fet, ha estat descrit que hi ha un efecte inductor del TNF α sobre el gen UCP3 en sistemes cel·lulars en els que la lipòlisi no sembla jugar un paper tant important, com el múscul esquelètic (*Villarroya 2003*)

En resum, podem concloure que bona part de les alteracions observades pel que fa a gens implicats en l'adipogènesi al teixit adipós de pacients infectats amb HIV-1 poden explicar-se com a conseqüència de l'acció del TNF α sobre aquests gens. A una conclusió semblant podem arribar en relació amb les alteracions en les proteïnes desacobllants UCP2 i UCP3. Pel contrari, és menys clar que l'acció del TNF α pugui explicar els efectes deleteris en marcadors de biogènesi mitocondrial, tot i

l'important efecte repressor de TNF α sobre el regulador mitocondriogènic PGC-1 α . Caldrà estudiar si altres fenòmens amb potencial regulador també presents en pacients "naïve" (com la inducció d'altres citoquines pro-inflamatòries o l'acció de proteïnes víriques del HIV-1) tenen un paper de més relleu en la repressió de gens implicats en la cadena respiratòria. En qualsevol cas, aquests resultats experimental constitueixen una primera aproximació directa al paper del TNF α sobre l'expressió gènica a la cèl·lula adiposa i caldrà en un futur esbrinar els mecanismes dels seus efectes així com les conseqüències funcionals que comporti.

REFERÈNCIES

Dahlman I, Forsgren M, Sjogren A, Nordstrom EA, Kaaman M, Naslund E, et al. Downregulation of Electron Transport Chain Genes in Visceral Adipose Tissue in Type 2 Diabetes Independent of Obesity and Possibly Involving Tumor Necrosis Factor- α . *Diabetes* 2006; 55:1792-1799.

Gasic S, Tian B, Green A. Tumor necrosis factor alpha stimulates lipolysis in adipocytes by decreasing Gi protein concentrations. *J Biol Chem.* 1999; **274**:6770-6775.

Solanes G, Pedraza N, Iglesias R, Giralt M, Villarroya F. Functional relationship between MyoD and peroxisome proliferator-activated receptor-dependent regulatory pathways in the control of the human uncoupling protein-3 gene transcription. *Mol Endocrinol.* 2003; 17:1944-58.

Spiegelman BM, Choy L, Hotamisligil GS, Graves RA & Tontonoz P. Regulation of adipocyte gene expression in differentiation and syndromes of obesity/diabetes. *J Biol Chem* 1993; 268:6823-6.

Villarroya, F. Mitochondrial uncoupling protein-3: beyond thermoregulation A "Recent Research Developments in Biochemistry". Research Signpost. ISBN: 81-7736-155-4, 2002, pp 56-72..

Warne JP. Tumour necrosis factor alpha: a key regulator of adipose tissue mass. *J Endocrinol.* 2003; 177:351-5.

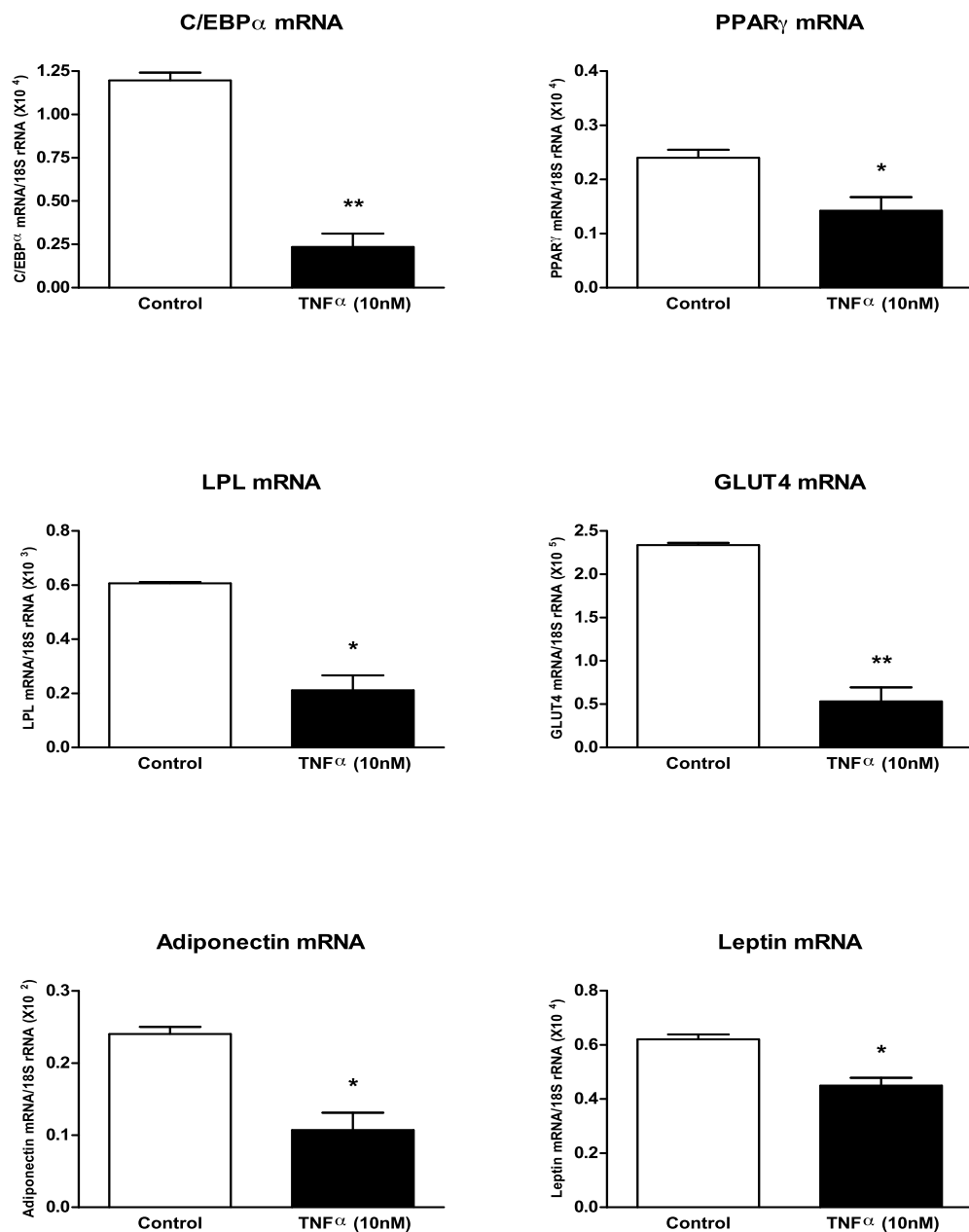


Figura 1: Nivells de l'mRNA de gens marcadors del metabolisme de l'adipòcit i l'adipogènesi, en cultius d'adipòcits control i tractats amb TNFα 10nM. A les figures hi ha representades les mitges mitjançant barres, i la \pm SEM amb les barres d'error. Els p-valors per les comparacions estadístiques entre grups s'han representat amb asteriscs: * (p<0.05) i ** (p<0.01).

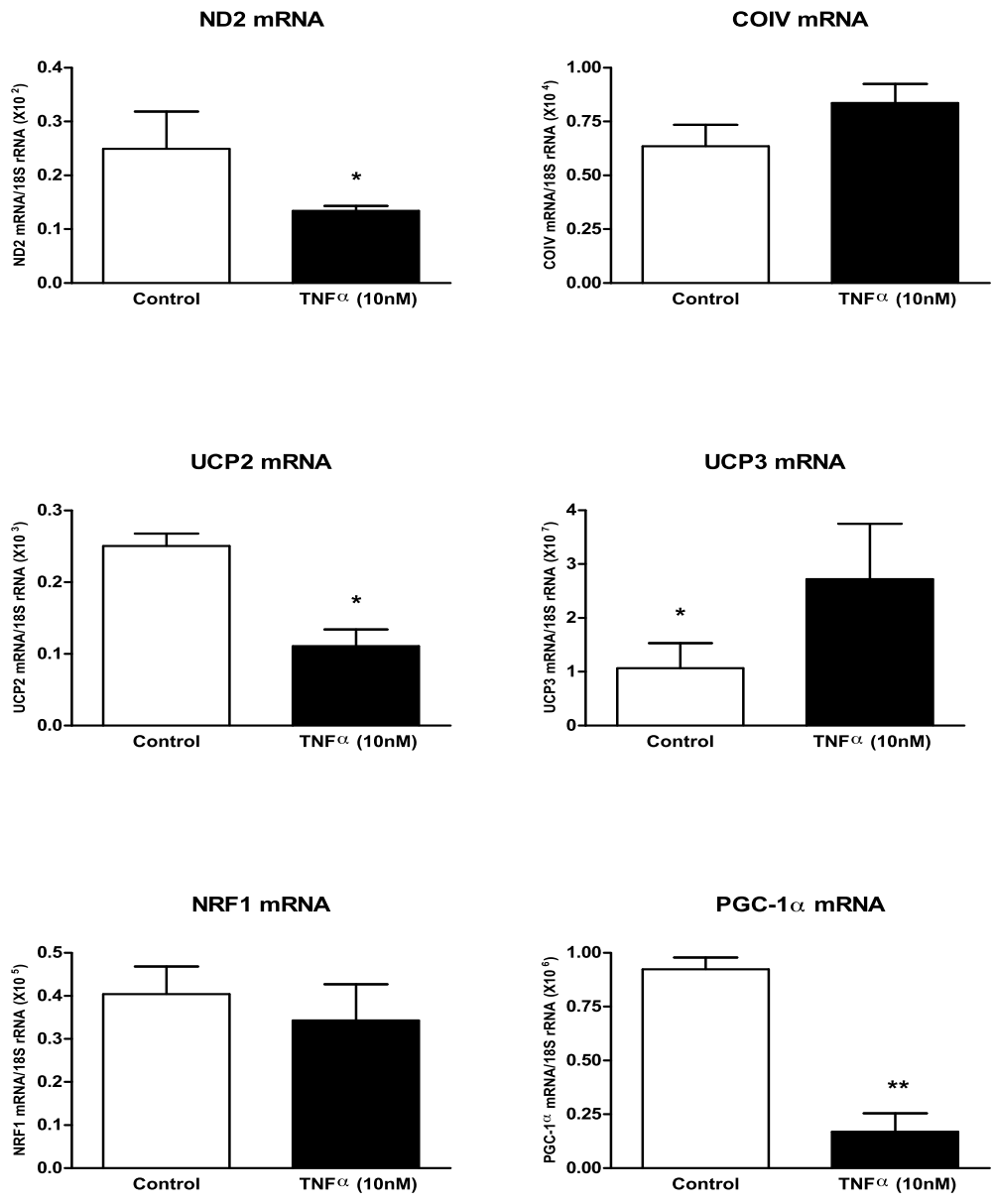


Figura 2: Nivells de l'mRNA de gens marcadors de la funció mitocondrial, en cultius d'adipòcits control i tractats amb TNF α 10nM. A les figures hi ha representades les mitges mitjançant barres, i la \pm SEM amb les barres d'error. Els p-valors per les comparacions estadístiques entre grups s'han representat amb asteriscs: * ($p < 0.05$) i ** ($p < 0.01$).

RESUM GLOBAL

RESUM GLOBAL

Una de les estratègies més òbvies a l'hora d'abordar l'estudi de l'etiopatologia d'una malaltia com la lipodistròfia associada a l'HIV-1 i la HAART és intentar identificar les diferències que hi ha entre diferents grups de pacients, de forma que cada grup representi un estadi d'afectació de la malaltia. Així, l'estudi dels patrons d'expressió d'mRNA dels gens del seu teixit adipós subcutani aportarà (o no) dades que aclariran el paper de diferents aspectes (infecció per HIV-1, tractament, etc.) sobre el ple desenvolupament de la malaltia. Fins ara, els estudis fets *in vivo* amb aquests pacients s'havien limitat a fer comparacions concretes de grups dos a dos per veure com el desenvolupament de la HALS afectava l'expressió gènica del teixit adipós subcutani: pacients diagnosticats amb la HALS respecte controls sans;^{345, 443} pacients HALS respecte pacients infectats sense tractament HAART (naïve);³⁰⁴ o pacients HALS respecte pacients infectats i en tractament però no lipodistròfics.^{347, 444, 445} Aquests estudis han demostrat que la teràpia antiretroviral causa alteracions significatives en l'expressió gènica del teixit adipós dels pacients HALS, sobretot, quan es comparaven els seus nivells d'expressió amb els dels controls no infectats. Aquest aspecte en concret va portar a pensar que els

fàrmacs que es fan servir en la HAART eren els agents causals de les anomalies en el teixit adipós. Però per contra i per primer cop, els resultats del nostre estudi (en el que també es comparen pacients naïve respecte controls sans) indiquen que la infecció del virus HIV-1 per sí mateix causa part de les alteracions de l'expressió gènica al teixit adipós subcutani, independentment de la toxicitat dels fàrmacs. Així doncs, el paper de l'HIV-1 i el procés infecció passarien a tenir una major rellevància en el desenvolupament de la HALS.

Una primera aproximació d'aquest treball a tota aquesta problemàtica fou l'estudi dels canvis en l'expressió gènica mitjançant l'anàlisi de gens coneguts marcadors de funcions relacionades amb la cadena respiratòria mitocondrial, la funció adipocitària específica (tant metabòlica com lligada a la diferenciació o la síntesi d'adipoquines) i la inflamació local al teixit adipós.

La majoria de les alteracions que es van trobar a nivell de l'expressió gènica entre els diferents grups respecte el grup de controls sans, ja eren presents al grup de pacients naïve, i eren mantinguts als grups de pacients infectats i tractats (independentment de si havien desenvolupat lipodistròfia o no). Així doncs, les petites diferències trobades

entre els demás grups serien associades específicament al tractament HAART i al desenvolupament de la lipodistròfia, com per exemple, el descens en els nivells de l'mRNA de la COX-II i l'augment dels d'UCP3 i Pref-1 (veure més avall). Per altra banda, tots els nostres resultats d'expressió gènica dels pacients HALS concorden amb els resultats d'altres estudis,^{304, 345, 347, 444, 445} excepte pel gen C/EBP α : en el nostre estudi quedava inalterat (almenys en termes de significativitat estadística) quan la seva expressió es veia disminuïda en altres.³⁴⁵ No obstant, cal dir que tot i observar tendències similars, les diferències d'expressió entre els pacients tractats (amb o sense HALS) no han estat significatius com en altres estudis (p.ex.: disminució dels nivells d'mRNA de PPAR γ , GLUT4, i adiponectina als HALS),^{444, 445} segurament a causa d'un número mostral per grup massa baix en el nostre estudi, tot i mostrar tendències similars.

Les nostres dades apunten a que la infecció de l'HIV-1 causa una alteració profunda en l'expressió de gens que codifiquen per proteïnes mitocondrials, independentment de si els seus trànscrits provenen del DNA nuclear o del DNA mitocondrial (com COX-IV i UCP2, i COX-II, respectivament). Ni l'expressió gènica del factor de transcripció NRF-1 ni la del coactivador PGC-1 α

correlacionen amb els canvis observats, cosa que indica que aquests factors no serien responsables de les alteracions observades en l'expressió de gens que codifiquen per proteïnes mitocondrials. La disminució en la concentració d'mRNA d'aquests gens es manté en els pacients tractats, encara que semblaria que el tractament milloraria lleugerament els nivells de les proteïnes mitocondrials COX-IV i UCP2 codificades a nivell nuclear. Per contra, el tractament antiretroviral, i l'aparició de la HALS més tard, provoquen una major disminució de l'expressió gènica de COX-II, que al seu torn correlaciona negativament amb el temps d'exposició a tots els fàrmacs. De fet, una de les hipòtesis actuals per explicar la patogènesi de la HALS és la toxicitat mitocondrial induïda pels NRTIs,⁴⁴⁶ i relacionat amb això, han estat detectades disminucions del contingut de DNA mitocondrial en el teixit adipós subcutani de pacients tractats amb la HAART, i més recentment, també ha estat establert que aquesta depleció provoca una disminució de l'activitat respiratòria mitocondrial.²⁸¹ Així doncs, els fàrmacs antiretrovirals (especialment els NRTIs), causarien una disminució de l'expressió gènica deguda a la depleció mitocondrial. Les nostres dades fan pensar que la infecció per part de l'HIV-1 és un factor desencadenant d'aquestes anomalies

en l'expressió gènica, tot i que les dades obtingudes de l'anàlisi transcriptòmic a través de "micrarray" donen més suport al paper desenvolupat pel tractament antiretroviral a les alteracions pròpiament mitocondrials (veure més endavant). L'alteració mitocondrial, més enllà d'una reducció en l'eficiència bioenergètica, podria causar apoptosi i modificar la producció d'espècies reactives (ROS), estant tots aquests esdeveniments relacionats amb el desenvolupament de lipoatròfia.⁴⁴⁷ La disminució de l'expressió d'UCP2, proteïna implicada en la protecció contra la producció de ROS,⁴⁴⁸ contribuiria a l'augment d'aquesta producció. Per contra, observem que l'expressió d'UCP3 no es veu afectada per la infecció del virus, però sí que s'indueix en els pacients sota tractament HAART que han desenvolupat la HALS. Això podria estar relacionat amb l'increment del nivell de lípids circulants en aquests pacients, ja que els àcids grassos són els principals activadors de la transcripció d'UCP3.⁴⁴⁹ Finalment, les dades sobre UCP1, ens indiquen que a diferència de la inducció específica observada en els casos de lipomatosi associada a HAART (veure més endavant),⁴²⁹ és una proteïna que no estaria involucrada en les alteracions lipoatròfiques del teixit adipós subcutani.

La diferenciació del teixit adipós i el manteniment del seu fenotip diferenciat requereixen de la participació de factors de transcripció claus, com PPAR γ i C/EBP α , que regulen l'expressió dels gens marcadors del teixit adipós. L'expressió del gen PPAR γ , de forma oposada a la del gen C/EBP α , disminueix dràsticament en els pacients infectats per l'HIV-1 sense tractament, i roman baixa en els tractats. Això és coherent amb altres fonts que ja havien trobat una reducció dels nivells d'mRNA de PPAR γ en els pacients HALS (tractats amb HAART), respecte als controls no infectats,³⁴⁵ i amb que, tant naives com pacients en tractament HAART tenen els mateixos nivells d'expressió de l'mRNA PPAR γ .³⁰⁴ L'expressió gènica dels marcadors adipocitaris LPL, GLUT4 i l'Adiponectina, tots ells dianes de la regulació per PPAR γ ,¹³¹ també es troba reprimida. Així doncs, la infecció de l'HIV-1 per sí sola tornaria a ser causa d'una profunda alteració en l'expressió gènica del teixit adipós, que sembla millorar amb el tractament antiretroviral, però que queda finalment estroçada a causa del desenvolupament de la HALS. Per contra, l'expressió del coactivador PGC-1 α és induïda per la infecció de l'HIV-1 i aquest increment es manté malgrat el tractament antiretroviral o el desenvolupament de lipodistròfia.

Recentment, s'ha descrit que les modificacions dietàries per tal de reduir el volum de greix en pacients obesos indueixen l'expressió de PGC-1 α en teixit adipós, la qual cosa, de la mateixa manera que en els nostres resultats, estaria associada a un increment de la lipòlisi, però també disminuiria l'expressió dels gens que codifiquen per PPAR γ , LPL, UCP2 i Leptina.⁴⁵⁰ No obstant, la HALS va associada amb un increment de l'expressió gènica de Pref-1, que estaria d'acord amb l'augment dels nivells de l'mRNA de Pref-1 observats en cultius cel·lulars d'adipòcits per la presència de PIs al medi.⁴⁵¹ Tenint en compte que Pref-1 és un factor regulador que inhibeix la diferenciació adipocitària, un increment en la seva expressió podria contribuir a la lipoatròfia dels dipòsits de greix. De la mateixa manera cal dir que, així com també ha estat descrit en les lipodistròfies adquirides o d'origen genètic i en els models murins de lipodistròfia,⁴⁵² les alteracions en l'expressió de gens del teixit adipós (com la leptina i l'adiponectina) podrien contribuir al desenvolupament de la resistència a insulina i a altres alteracions com les trobades als pacients diagnosticats amb la HALS.

En el cas de TNF α , la infecció pel virus HIV-1 també resultaria determinant en l'augment de la seva expressió gènica. Cal remarcar que s'ha descrit un increment de TNF α (i

altres citokines proinflamatòries) en el teixit adipós dels pacients amb la HALS, tant per a TNF α produït a nivell sistèmic⁴⁵³ com a nivell local.³⁴⁶ Per altra banda, TNF α té efectes paracrins i autocrins sobre els adipòcits fent que disminueixin la seva diferenciació adipocitària i la resposta a la insulina, i que augmentin la lipòlisi, l'apoptosi i la disfunció en la cadena respiratòria mitocondrial.³⁵² Relacionat amb això, és interessant remarcar que, segons els nostres resultats l'expressió de TNF α correlaciona negativament amb l'expressió del factor adipogènic PPAR γ i els marcadors del teixit adipós (leptina i adiponectina inclosos). Més encara, quan per la majoria d'aquests gens s'ha descrit que poden ser inhibits per TNF α . Per contra, el coactivador PGC-1 α és activat per TNF α i citokines relacionades,²³⁷ tot i que no és clar que n'incrementi l'expressió gènica (veure més endavant). A més de la inducció de TNF α per l'efecte directe de la infecció de l'HIV-1, els PIs i NRTIs també podrien mediar un increment encara més gran de TNF α al ser alguns d'aquests fàrmacs inductors de la seva expressió i secreció en cultius d'adipòcits *in vitro* (veure revisió).³³⁸ L'acció combinada de tots aquests efectes podria contribuir a la patogènia de la HALS, amb la infecció per l'HIV-1 com a agent desencadenant.

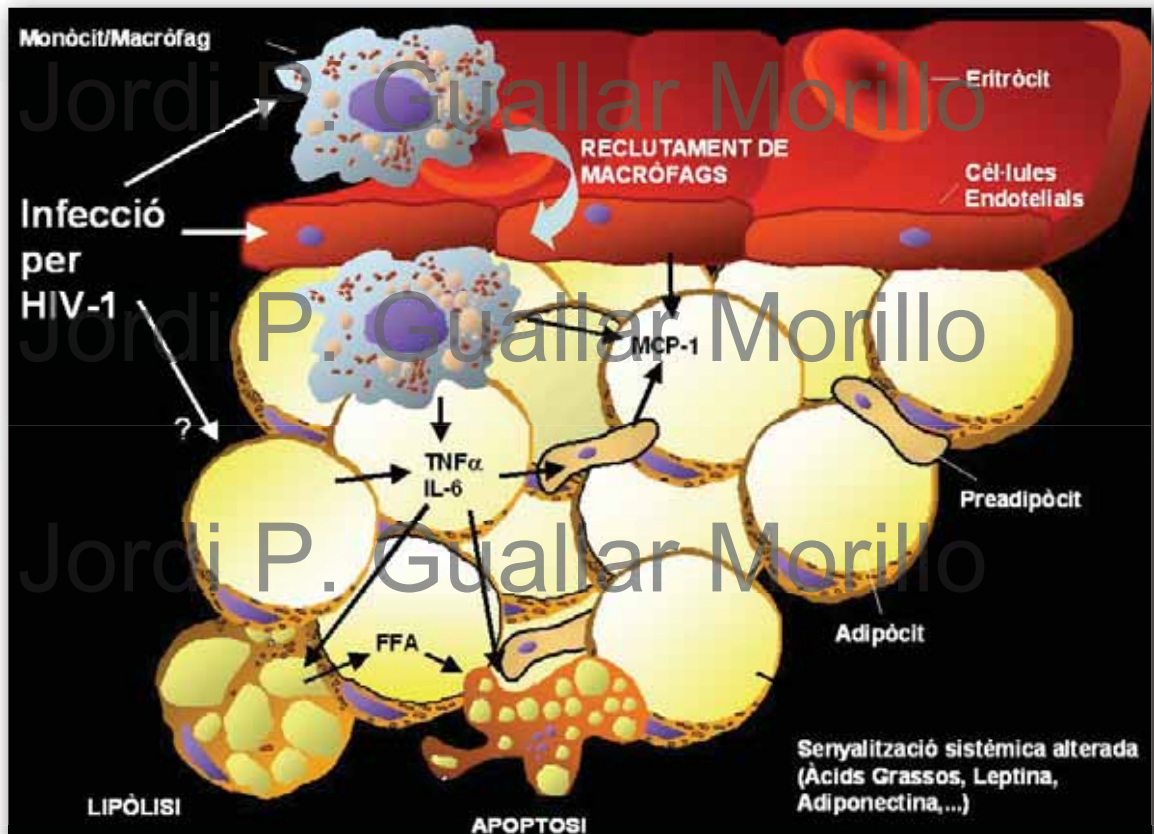


Figura 16.

Ambient proinflamatori dins del teixit adipós subcutani. Principals esdeveniments que desencadenarien tot el procés lipotàctic.

Segons aquestes dades, nosaltres proposaríem estudiar la possibilitat que, el desenvolupament d'un estat inflamatori mediat per l'exposició del teixit adipós a un increment local de citocines proinflamatòries i/o a l'acció de proteïnes virals amb efectes paracrins i endocrins, serien la clau principal de tots els esdeveniments posteriors per donar lloc a la HALS.

De manera general, la infecció per l'HIV-1 provocaia una activació de les cèl·lules endotelials, macròfags i potser dels propis preadipòcits i adipòcits, iniciant-se així tota una cascada d'esdeveniments inflamatoris.³⁵² Un dels episodis dins d'aquest

procés el constituïria el pas de l'HIV-1 a través de la barrera endotelial (a coll de monòcits infectats), de la que al seu torn en podria resultar una infecció dels adipòcits, especialment quan aquests fossin estimulats per citocines proinflamatòries com $TNF\alpha$.⁴⁵⁴ I potser també IL-6 o fins i tot quimioquines com MCP-1 que es sap que estan implicades en processos inflamatoris del teixit adipós en situacions com l'obesitat. Emmarcat també dins d'aquest procés, proteïnes de l'HIV-1 com Tat i Vpr, que són alliberades per les cèl·lules que han estat infectades, podrien ajudar a la inducció del

procés inflamatori en el teixit adipós subcutani dels pacients infectats i afectar-ne directament l'expressió gènica.⁴⁵⁵ Paral·lelament a tot això, al teixit adipós subcutani dels pacients infectats diagnosticats amb HALS també s'hi troben lipogranulomes i macròfags infiltrats.^{317, 318} Aquests macròfags, segurament activats, podrien estar alliberant citoquines i quimioquines proinflamàtories, i d'aquesta manera, la font de canvis inflamatoris a nivell cel·lular no només implicaria als adipòcits del teixit adipós subcutani sinó que també inclouria als macròfags i a les cèl·lules endotelials. Així doncs, podria establir-se una regulació per retroalimentació entre aquests tipus cel·lulars, resultant en conjunt un entorn d'activació inflamatòria. En els adipòcits, les adipocitoquines influenciarien unes la producció de les altres, i dins d'aquest context, la disminució de l'expressió gènica de la leptina i l'adiponectina contribuirien a accentuar aquest ambient inflamatori ja que ambdues adipocitoquines tenen propietats antiinflamatòries. L'efecte net del canvi en les adipocitoquines seria la reducció de la massa de teixit adipós tant a nivell del volum de cada adipòcit (per efectes lipolítics i resistència a la insulina) i a nivell del número d'adipòcits (efectes de desdiferenciació i apoptosi), contribuint tot plegat a la lipoatròfia en els pacients infectats per l'HIV-1.

En el segon article, l'estudi de l'expressió dels gens que codifiquen pels transportadors de nucleòsids constitueix el primer treball fet amb aquestes proteïnes de membrana a nivell teixit adipós humà, i en conseqüència, el primer punt a destacar és que, tant al teixit adipós com als cultius cel·lulars d'adipòcits humans, s'expressa tot el panell de transportadors de nucleòsids identificats: SLC28A1, SLC28A2, SLC28A3 (hCNT1, hCNT2 i hCNT3, respectivament), i SLC29A1, i SLC29A2 (hENT1 i hENT2, respectivament). En certa manera, això no era previsible tenint en compte que els CNTs només han estat descrits en epitelis i macròfags.^{66-68, 456-458} No obstant, CNT1 i CNT2 ja havien estat detectats al teixit adipós marró de rata.⁶⁶

Aquestes dades subratllen la complexitat del patró de l'expressió gènica dels NTs al teixit adipós, cosa que per altra banda seria molt important de cara a la modulació del transport i disponibilitat de nucleòsids a nivell del teixit adipós. Com ha estat descrit, els adipòcits no només secreten adenosina sinó també inosina i hipoxantina.⁴⁵⁹ De fet, els dos últims compostos es creu que són els més secretats a les suspensions d'adipòcits. La inosina és un substrat d'alta afinitat per hCNT2 i hCNT3,^{63, 71} mentre que la hipoxantina només pot ser

transportada per hENT2.^{75, 76} La necessitat de reciclar aquests dos compostos explicaria la coexpressió de diferents NTs en aquest tipus cel·lular. Més encara, s'ha proposat que hENT1, i més recentment hCNT2, modularien els nivells de l'adenosina a nivell de cervell i fetge.⁴⁶⁰⁻⁴⁶³ En qualsevol cas, hCNT3 també seria un possible candidat per dirigir la reabsorció cel·lular d'adenosina tot i que fins al moment, no s'ha descrit cap cas que relacioni la funció d'hCNT3 amb els efectes relacionats amb l'adenosina. Aquests efectes de l'adenosina a nivell extracel·lular consisteixen en la inhibició de la lipòlisi per part dels adipòcits quan aquesta és present al medi de cultiu, i en l'activació de la lipòlisi quan, presumiblement, el medi de cultiu és deplecionat d'aquesta per mitjà de l'addició d'adenosina desaminasa (ADA).⁴⁶⁴ Aquests efectes associats a l'adenosina són mitjançats pels receptors A1 (A1R) presents a la membrana plasmàtica dels adipòcits. De manera interessant, l'activitat del transportador d'alta afinitat CNT2 a les cèl·lules parenquimals del fetge, se sap que és induïda per l'activació d'A1R mitjançant un mecanisme que necessita l'obertura d'un canal Katp, cosa que conseqüentment, estaria potenciada per un baix nivell d'energia intracel·lular.

Encara que ningú s'ha plantejat el fet que els transportadors de nucleòsids puguin estar modulant el

metabolisme energètic dels adipòcits, aquesta seria una possibilitat que hauria de ser estudiada amb més detall. En qualsevol cas, el patró d'expressió dels diferents NTs dins d'aquest tipus cel·lular ja anticipa una complexa interacció entre transportadors que acabaria donant lloc a una regulació acurada de la reabsorció de l'adenosina, i paral·lelament, de l'activació purinèrgica a través dels receptors P1 als adipòcits.

L'anàlisi de la relació entre la funció dels NTs i la regulació del metabolisme energètic de l'adipòcit és un dels objectius a aconseguir d'aquest estudi, i en aquest sentit, és molt intrigant que la infecció a través del virus HIV-1 per sí sola quan encara no s'ha rebut cap tractament, pugui alterar l'expressió gènica dels NTs. Això és particularment evident en el cas del gen del transportador d'adenosina hCNT3, així com també ho és pels dos gens que jugarien un paper encara més important en el reciclatge de nucleòsids i nucleobases hENT2 i hCNT1. Com hem vist anteriorment, tenim proves que l'HIV-1 per sí sol podria promoure alteracions en l'expressió gènica de l'adipòcit, ja sigui en gens que codifiquen per proteïnes mitocondrials, i així implicats en el metabolisme energètic, com també, en l'adipogènesi. En aquest estudi, s'identifiquen altres gens que es veuen regulats per aquesta infecció, però

que tenen com a tret distintiu que són transportadors de membrana citoplasmàtica que contribuirien a la regulació del metabolisme adipocitari, i a l'adipositat, així com també al reciclatge de nucleòsids i nucleobases.

Per altra banda, a part dels efectes provocats per la infecció, el desenvolupament de la HALS també està associat a canvis significatius de l'expressió gènica dels NTs, com es veu amb l'increment dels nivells d'mRNA del gen SLC28A2 (hCNT2) i els gens SLC29 (hENT1 i hENT2) a les biòpsies de pacients lipodistròfics. Aquest resultat anticipa un paper important de les alteracions del reciclatge de nucleòsids (adenosina entre d'altres) i nucleobases als adipòcits en el desenvolupament de la HALS.

Com s'ha descrit a l'estudi del primer article, l'increment de TNF α com a resultat del procés inflamatori desencadenat per la infecció, donava lloc a l'alteració de l'expressió gènica d'un primer bloc de gens del teixit adipós. Paral·lelament, en alguns estudis s'ha proposat que TNF α modularia els nivells d'mRNA dels gens que codifiquen pels NTs als macròfags de ratolí i les cèl·lules parenquimals del fetge de rata.^{68, 84} Tenint en compte els primers gens induïts després de la infecció de l'HIV-1 (SLC28A1, SLC28A3, i SLC29A2, codificant per hCNT1, hCNT3, i hENT2, respectivament),

abans del tractament i el desenvolupament de la HALS, els resultats indiquen que l'increment de TNF α podria explicar la inducció dels gens hCNT1 i hCNT3, tenint en compte que aquesta citoquina per sí sola pot simular aquest efecte en cultius d'adipòcits. En qualsevol cas, l'augment dels nivells d'mRNA del gen que codifica per hENT-2 als pacients infectats per l'HIV-1, no tractats i no lipodistròfics, hauria de ser explicat per altres causes associades a la infecció de l'HIV-1, ja que els cultius primaris d'adipòcits humans no mostren canvis significatius dels nivells d'mRNA d'hENT2 quan són tractats amb TNF α . També caldria aprofundir més en per què la disminució dels nivells d'mRNA d'hENT1 i hCNT2 observats *in vitro*, com a resposta de TNF α , no es dona als pacients infectats. En aquest sentit, l'anàlisi preliminar d'alguns marcadors gènics de la biogènesi mitocondrial i adipogènesi és poc clar que puguin ser explicats com a conseqüència de l'acció de TNF α sobre aquests gens (veure annex de resultats de TNF α). De fet, la inducció per TNF α al teixit adipós dels pacients infectats per l'HIV-1 tan sols sembla ser una component de tota la resposta inflamatòria, en la que múltiples citoquines i altres agents reguladors estarien implicats, i en alguns casos, jugar papers oposats en el control de l'expressió de gens concrets.

Tenint en compte l'increment de macròfags infiltrats al teixit adipós dels pacients HALS,³¹⁸ la possibilitat que l'expressió d'NTs als macròfags pugui haver influenciat l'anàlisi de l'expressió dels NTs de les mostres de teixit adipós, especialment als grups LD- i LD+, no pot ser descartada. No obstant, que l'expressió del marcador de macròfags CD68 dels pacients naive respecte els controls sans romanguí sense alteracions, indica que l'increment de l'expressió de TNF α i l'augment dels nivells d'mRNA d'alguns dels gens que codifiquen pels NTs als pacients naive són probablement deguts als adipòcits o altres tipus cel·lulars dins de les localitzacions de teixit adipós, però no per macròfags de manera important. Això és consistent amb el fet que, per exemple, ENT1 és un NT del que se sap que s'expressa de manera important a macròfags⁶⁷ i no s'han observat alteracions als nivells d'mRNA d'hENT1 als pacients naive. No obstant, no es pot menystenir que els macròfags contribueixin fins a cert punt als canvis d'expressió dels NTs.

El desenvolupament de la HALS està particularment associat a l'increment dels nivells de l'mRNA d'hCNT2 i hENT2. CNT2 no és diana de TNF α a les cèl·lules parenquimals de fetge de rata (encara que sembla que és així als macròfags de ratolí),^{67, 68, 84} però és diana d'altres agents com els glucocorticoides i

TGF β .³¹⁸ Encara que no tenim una explicació per l'aparent repressió dels nivells d'mRNA d'hCNT2 dels cultius cel·lulars d'adipòcits tractats amb TNF α , la regulació diferencial dels gens SLC28 indicaria que la hipòtesi que els tres NTs pels que codifiquen, hCNT1, hCNT2, i hCNT3, podrien jugar diferents papers dins de la fisiologia cel·lular a través del reciclat de nucleòsids.

Un altre punt important relacionat amb aquestes dades és el fet que el subministrament de nucleòsids naturals (p.ex. la uridina) podria ajudar a combatre alguns dels efectes nocius de la HAART.²⁹⁵ Posat que, encara que amb diferent afinitat, tots els NTs expressats als adipòcits poden transportar uridina,⁴⁶⁵ els canvis en l'expressió dels NTs associats a la infecció per HIV-1 i el desenvolupament de la HALS podrien determinar capacitats diferents dels adipòcits per concentrar intracel·lularment aquests nucleòsids amb potencial terapèutic com la uridina.

Com s'ha comentat, un dels aspectes més importants de la HALS és la lipoatròfia del teixit adipós subcutani. Existeixen altres malalties on aquesta característica és comuna, i una d'elles és la lipodistròfia parcial adquirida (APL) o síndrome Barraquer-Simons. Tot i la molt infreqüent presència d'aquesta malaltia, ens ha estat possible estudiar el teixit adipós d'una pacient d'APL.

Els resultats de l'estudi dut a terme amb la mostra d'aquesta pacient, indiquen una alteració de l'expressió dels gens associats al procés de diferenciació adipocitària, cosa que inclou els gens relacionats amb el metabolisme del teixit adipós i PPAR γ , el gen clau de la regulació de l'adipogènesi. pRB i Pref-1 no mostren alteracions de la seva expressió, suggerint així que aquests factors antiadipogènics no contribueixen a l'alteració adipogènica de la pacient. Per contra, la repressió de PPAR γ n'és probablement la principal causa, desregulant al seu temps l'expressió de gens que codifiquen per components del metabolisme adipocitari o per adipoquines, com per exemple GLUT4, LPL o l'adiponectina.¹³¹ Es conegut que la manca de PPAR γ , ja sigui per haploinsuficiència o per efecte dominant doble negatiu, dona lloc a la lipodistròfia parcial familiar (Dunnigan) de tipus 3,⁴⁶⁶ i de la mateixa manera, com ja hem vist, l'expressió de PPAR γ també es veu reduïda en pacients HALS.^{345, 467} Sembla doncs que la disminució de l'activitat de PPAR γ , sigui quin sigui el seu origen, seria un aspecte comú a diferents tipus de lipodistròfies. I en consonància amb aquesta observació, els nivells circulants normals de leptina observats en la pacient APL també es troben en els pacients HALS.

La principal diferència entre la pacient APL i els pacients HALS recau en la component inflamatòria de la malaltia. Així, mentre l'expressió gènica dels gens marcadors d'inflamació als pacients HALS estan sistemàticament induïts,^{345, 346, 467} a la pacient APL mostren una expressió totalment normal que descartaria qualsevol tipus d'implicació inflamatòria en l'origen de l'APL.

Un altre fet remarcable d'aquest estudi és la identificació d'una reducció de l'expressió dels gens de la cadena respiratòria de la pacient APL. aquesta observació és comuna als pacients HALS. Així doncs, aquestes dades, representen la primera identificació d'alteracions mitocondrials del teixit adipós en una forma de lipoatròfia no associada a una infecció vírica, tractament antiretroviral, ni depleció de mtDNA. A més, assenyala l'alteració de la funció mitocondrial com a potencial agent causal de la lipoatròfia, independentment de quins factors l'arribin a originiar (i que encara hauran de ser investigats). Dades recents han assenyalat que la biogènesi mitocondrial juga un paper important en el procés de diferenciació adipocitària,⁴⁶⁸ que encaixaria amb l'alteració mitocondrial com a agent causal del fenomen lipoatròfic. No obstant, altres factors relacionats amb alteracions mitocondrials com les

mutacions del gen de la tRNALys al mtDNA donen lloc a lipomatosi en comptes de lipoatròfia perifèrica (veure més endavant), i per tant, no per presentar-se alteració de l'activitat mitocondrial es podrà presuposar el desenvolupament de lipoatròfia del teixit adipós.

En línies generals, l'anàlisi de l'expressió gènica dels diferents grups de pacients descrits al primer article mitjançant la tècnica del microarray ha permès que es confirmessin resultats que ja s'intuïen, i a reforçar amb noves dades, aquells que tenien una consistència estadística. L'anàlisi a través de microarrays fa que això sigui possible al treballar amb un major número de gens (tot el genoma) pertanyent a cada via metabòlica, i que a més, això es faci al mateix temps per a cada pacient.

Així, una de les primeres constatacions importants és el fet que a l'ordenar tots aquests resultats d'expressió gènica en forma de dendrograma, veiem que el grup de controls sans es comporta completament diferent del que seria tota la resta de pacients infectats. De la mateixa manera, dins d'aquest grup de pacients infectats, la divergència més gran és la que es dona entre el grup dels pacients naive i la resta de pacients tractats amb la HAART. Finalment, l'última divisió i la que té menys pes específic, és la que trobem entre pacients que han desenvolupat la HALS i els que no

dins del grup de pacients tractats. Aquests resultats reafirmen la importància que tenen, tant la infecció de l'HIV-1 com el tractament HAART, a nivell del patró general de l'expressió gènica dins del teixit adipós (com ja s'havia suggerit), i a més, ratifica la importància biològica de la configuració dels grups entre els que s'ha repartit als pacients.

Per altra banda, també es va trobar que l'absència de tractament està associada a una modificació significativa de l'expressió gènica del grup de gens relacionats amb la inflamació, la immunitat associada a les cèl·lules T i la immunitat associada a interferó. Aquest fet no deixa de ser esperable tenint en compte que el número de cèl·lules del sistema immune està considerablement reduït durant les primeres fases de la infecció (veure introducció). Així mateix, els gens relacionats amb l'oxidació d'àcids grassos ja presenten alteracions a nivell del grup de pacients naive. Tots aquests grups de gens romanen igualment alterats en els pacients sota tractament HAART sense signes de lipodistròfia. No obstant, els grups de gens d'immunitat associada a macròfags i de destoxicació, mostren alteracions específiques en aquest grup de pacients, que presumiblement, estarien d'acord amb la reducció del títol víric a causa del tractament i es permetria així la recuperació del número de macròfags

i limfòcits T per una banda, i la inducció de tota la maquinària enzimàtica necessària per metabolitzar els fàrmacs subministrats. En canvi, l'alteració de l'expressió de gens de la cadena de transport d'electrons apareix per primer cop associada al tractament, i aquestes alteracions semblen estar reforçades dins del teixit adipós dels pacients lipodistròfics, cosa que lligaria amb els possibles processos de toxicitat mitocondrial que desencadenarien els fàrmacs del tractament. Per altra banda, els pacients lipodistròfics semblen ser els únics que presenten una alteració de l'expressió dels gens associats a apoptosi, i a més, l'activació dels gens associats al catabolisme dels àcids grassos. Això estaria d'acord amb les hipòtesis proposades al primer treball, consistents en què tant la infecció de l'HIV-1 com els efectes dels fàrmacs podrien provocar una alteració de la biogènesi mitocondrial que, a través de toxicitat mitocondrial, donaria lloc a apoptosi. Per altra banda, l'activació del catabolisme d'àcids grassos, respondria a l'alta concentració d'àcids grassos lliures resultants del procés lipoatròfic del teixit adipós subcutani.

Un altre punt de controvèrsia dins de la HALS és l'aparició de lipomatosi. En vista dels resultats obtinguts, es podria dir que l'expressió gènica d'UCP1 present a les “gepes de búfal” és una alteració

específica d'aquesta localització i no del teixit adipós subcutani de pacients infectats per l'HIV-1 i sota tractament HAART, on la seva expressió és indetectable. Això establiria que les alteracions en el patró de diferenciació de l'adipòcit blanc cap a marró és característic de les “gepes de búfal” i no una característica comuna dels pacients tractats amb HAART. Ha estat descrit que l'estavudina i la nevirapina poden induir l'expressió gènica d'UCP1 i la diferenciació dels adipòcits blancs cap a adipòcits marrons en cèl·lules en cultiu,⁴⁶⁹ però això no pot explicar la diferència entre l'expressió gènica d'UCP1 entre el teixit adipós de les “gepes de búfal” i el teixit adipós subcutani, tenint en compte que no hi havia cap diferència en la presència d'aquests fàrmacs als règims del tractament HAART que rebien els dos grups de pacients estudiats. De fet, una publicació prèvia indicava que cap dels components del tractament HAART pot ser associat a l'aparició de les “gepes de búfal”.⁴³² Per altra banda, una altra característica del greix de les “gepes de búfal” és l'activació de la biogènesi mitocondrial (fort augment de la VDAC), que és conseqüent amb aquesta adquisició del fenotip de teixit adipós marró, tot i la disminució de components de la cadena respiratòria per toxicitat dels fàrmacs antiretrovirals (veure més endavant). No obstant, l'expressió de

PGC-1 α i UCP3 roman sense canvis respecte els controls, per contra del què passa a les zones lipoatròfiques. Se sap que aquests dos gens s'expressen més al teixit adipós marró que al blanc,^{227, 470} indicant això que el teixit adipós de les “gepes de búfal”, adquireix algunes de les característiques del teixit adipós marró, més que desenvolupar completament el seu fenotip. Això es correspon amb les dades que indiquen que la morfologia dels adipòcits de les “gepes de búfal” presenten un aspecte intermedi entre blanc i marró.⁴²⁷ Per altra banda, donat que els àcids grassos no esterificats activen l'expressió d'UCP3,⁴⁷¹ l'alta expressió d'UCP3 en el teixit adipós dels pacients amb lipodistròfia ha estat atribuïda a l'activació de la lipòlisi, un esdeveniment que és poc probable que es doni a les “gepes de búfal” per desenvolupar un paper d'acumulació de greix.

De forma semblant, la reducció dels nivells de mtDNA i de components de la cadena respiratòria al greix de les “gepes de búfal” i al greix subcutani és conseqüent amb l'efecte de la toxicitat mitocondrial del tractament antiretroviral, i potser la infecció de l'HIV-1. Més encara, les “gepes de búfal” mostren un augment generalitzat de proteïnes mitocondrials, a l'igual que al greix subcutani. Aquest fenomen també ha estat observat al teixit adipós

lipoatròfic de pacients tractats sota règims HAART que contenen NRTIs, i s'ha interpretat com un intent de compensació per part de les mitocondries per contrarrestar els baixos nivells de mtDNA que hi ha en aquests casos, simulant el què passa al múscul d'alguns pacients que pateixen malalties del mtDNA. Aquestes observacions indiquen que la depleció del mtDNA és poc probable que constitueixi un mecanisme etiopatològic important per la determinació que una localització de teixit adipós pateixi atròfia o hipertròfia en pacients sota tractament HAART.

Pel què fa a la regulació de l'adipogènesi, les dades obtingudes indicarien que PPAR γ no es troba reprimat a les “gepes de búfal”, a diferència del què passa al teixit subcutani dels pacients. De fet, això és coherent amb l'augment progressiu de la massa adiposa de les “gepes de búfal”, i també, amb que els gens involucrats en l'acumulació de greix com la lipoproteïna lipasa o l'adiponectina (que són dianes de PPAR γ),^{472, 473} estiguin induïts respecte el teixit adipós subcutani. Com hem vist anteriorment (veure el primer article), la reducció de l'expressió de PPAR γ al teixit adipós subcutani és un dels primers esdeveniments que acabaran conduint al desenvolupament de la HALS. Tot i així, aquesta repressió sembla que només s'associa a la

lipoatròfia però no a altres manifestacions de les alteracions associades al tractament HAART, com les “gepes de búfal”. Cal remarcar doncs, que aquesta major expressió de PPAR γ als lipomes respecte el teixit adipós subcutani no lipomatós dels pacients infectats per l’HIV i en tractament HAART, hauria de tenir-se en consideració sabent que les tiazolidinediones (activadores de PPAR γ) són considerades potencials agents terapèutics de la lipodistròfia. Les tiazolidinediones podrien ser una solució farmacològica per al tractament de la lipodistròfia, així com també per la resistència a la insulina associada, ja que se sap que aquests fàrmacs incrementen la massa de greix subcutani i redueixen la resistència a insulina en els pacients de diabetis mellitus de tipus II.³⁴⁴ Malgrat la millora de l’expressió gènica al teixit adipós mitjançant les tiazolidinediones,⁴⁷⁴ alguns estudis no estarien d’acord amb aquest ús de les tiazolidinediones. Els resultats que aporta aquest estudi anticiparien que, tot i els possibles efectes beneficiosos, el tractament per tiazolidinediones podria augmentar el risc de desenvolupar lipomatosi. De fet, recentment i d’acord amb això, s’ha descrit un cas de lipomatosi múltiple en un pacient que estava sota tractament HAART just després de tractar-lo amb rosiglitazona.⁴⁷⁵ El fet que l’expressió gènica d’UCP1,

específicament induïda als lipomes, també és una diana activada per tiazolidinediones (a través de PPAR γ),⁴⁷⁶ destaca la cura amb què s’hauria d’anar a l’hora d’administrar aquest fàrmac per tal d’evitar un increment de les possibilitats de desenvolupar “gepa de búfal”. D’altra banda, l’expressió de la proteïna SREBP1 al teixit adipós ha estat descrita com una alteració característica del teixit adipós subcutani dels pacients infectats per l’HIV-1 i sota tractament HAART, que a més, tenien lipoatròfia perifèrica.³⁴⁵ Es creu que l’acumulació d’SREBP1 es dona a resultes del seu processament defectuós. Aquest fenomen també és present al teixit adipós subcutani lipoatròfic dels pacients del nostre estudi, però a l’igual que per a altres reguladors adipogènics, això no passa a les “gepes de búfal”.

Per altra banda, el teixit adipós subcutani dels pacients infectats per l’HIV-1 que estan tractats amb la HAART, sembla ser l’escenari d’un procés inflamatori, tal i com ho indiquen els alts nivells d’expressió de TNF α i la β 2-microglobulina, i d’altres citokines proinflamatòries (veure primer article).^{317, 345} Com ja s’ha comentat, algunes de les alteracions de l’expressió gènica de les zones lipoatròfiques, com la repressió de PPAR γ i els subseqüents marcadors d’adipogènesi (p.ex. LPL, o adiponectina), es podrien explicar a través de la repressió originada pels

alts nivells de TNF α . Com també ja hem discutit, això es correlaciona amb els nostres resultats sobre l'efecte inhibidor de TNF α en adipòcits humans en cultiu per aquest marcador adipogènic. Per contra, l'absència d'aquesta inducció de TNF α i d'altres dianes proinflamatòries directes com la β 2-microglobulina a la gèpa de búfal, concordaria amb els nivells normals dels factors de transcripció i les seves dianes. Així, encara que les raons per les que la infecció de l'HIV-1 juntament amb la HAART no provoquen aquest ambient inflamatori a les "gèpes de búfal" són desconegudes, les observacions obtingudes explicarien l'absència d'alteracions adipogèniques. L'anàlisi microscòpic del teixit adipós lipoatròfic mostra una alta infiltració de macròfags que podrien contribuir al desenvolupament d'aquest marc local d'inflamació.^{303, 318, 320} Una inducció inflamatòria com aquesta també s'ha pogut observar al teixit adipós subcutani lipoatròfic dels pacients d'HIV-1 a través de l'expressió del marcador de macròfags CD68 (veure article dels NTs). De forma interessant, els nivells d'expressió de l'mRNA de CD68 eren significativament més baixos a les "gèpes de búfal", indicant això que en aquesta localització, la infiltració de macròfags no està induïda.

Com hem vist al primer treball,

el gen Pref-1 és un inhibidor de l'adipogènesi que es troba induït al teixit adipós subcutani dels pacients infectats per l'HIV-1 sota tractament HAART. Això concordava, amb la repressió d'altres gens marcadors de la diferenciació adipocitària com PPAR γ . No obstant, el greix de les "gèpes de búfal" no mostra aquesta inducció de l'expressió de Pref-1, i de fet, aquests nivells d'mRNA serien compatibles amb un alt estat proliferatiu de les cèl·lules dels lipomes. En aquesta línia, s'ha proposat que els inhibidors de proteasa podrien induir específicament l'expressió de Pref-1.⁴⁵¹ Tot i així, la diferència d'expressió de Pref-1 als lipomes de pacients tractats amb un règim d'inhibidors de proteasa similar al de pacients que no desenvolupen aquesta alteració, suggeriria que l'alteració de Pref-1 no pot ser atribuïda totalment als inhibidors de proteasa.

L'alta expressió de PCNA estaria d'acord amb la hipòtesi que les cèl·lules adiposes de les "gèpes de búfal" estarien patint un procés intrínsec d'inducció de la proliferació cel·lular. Així mateix, això concordaria amb una possible menor reducció de l'expressió de C/EBP α . Al teixit adipós de pacients sans, C/EBP α s'associa a la diferenciació adipocitària, però també a l'aturada del cicle cel·lular.⁴⁷⁷ L'expressió de C/EBP α a les "gèpes de búfal"

indica que els adipòcits d'aquesta localització podrien estar modificats per combinar el manteniment del fenotip adipocitari amb la capacitat de proliferar. Cal tenir present que durant el transcurs de reconstruccions de zones facials lipoatròfiques per mitjà de cirurgia plàstica, s'ha observat que l'autotransplant de teixit adipós de "gepes de búfal" a aquestes zones pot donar lloc a lipohipertròfia progressiva, és a dir, un augment continu de greix a les galtes, anteriorment lipoatròfiques, com a conseqüència del transplantament.⁴²⁸ Això indica que les cèl·lules de les "gepes de búfal" haurien adquirit una alta capacitat proliferativa que a més es manté quan són reubicades en un ambient lipoatròfic, cosa que concorda amb les dades d'expressió gènica de les "gepes de búfal". No obstant, cal tenir en compte que l'expressió de PCNA va resultar ser bastant variable entre les diferents "gepes de búfal" analitzades, cosa que apuntaria a una adquisició variable de l'estat proliferatiu. Això explicaria perquè l'augment del teixit adipós de les galtes després de l'autotransplantament només es dona en alguns pacients. Finalment, aquest alt estat proliferatiu de les cèl·lules de les "gepes de búfal" estaria d'acord amb l'aparició de característiques de teixit adipós marró, donat que aquest té una alta capacitat d'augment en resposta a estímuls ambientals²²² i a la

inhibició de supressors de la proliferació cel·lular, com per exemple la proteïna del retinoblastoma (pRB), que se sap que promouen la diferenciació de teixit adipós marró respecte el blanc.⁴⁷⁸

Un altre tipus d'acumulació de teixit lipomatós a la zona anatòmica de la "gepa de búfal", tot i que no relacionat amb la HALS, és el que apareix com a resultat de la mutació del gen tRNA^{Lys} del mtDNA. En els pacients analitzats amb aquesta malaltia, a l'igual que als lipomes associats a la HALS, es va trobar expressió gènica d'UCP1. Això reforçaria la idea que la lipomatosi és associada a l'aparició de trets fenotípics de teixit adipós marró. Tot i així, l'aparició de característiques del teixit adipós marró implicarien una activació de l'expressió de transcrits de components de la cadena respiratòria, i això tampoc és present en aquests tipus de lipomes, com tampoc ho són els nivells d'mRNA de PGC-1 α . Així doncs, aquests resultats mostrarien un patró d'expressió adipocitari distorsionat mostrant característiques d'adipòcits marrons, però no l'adquisició d'un fenotip complet de teixit adipós marró.

De la mateixa manera que als lipomes HALS, el manteniment dels nivells de C/EBP α concorda amb el manteniment de les característiques de teixit adipós dins dels lipomes, però també indica que les alteracions

moleculars que es deriven de la mutació del tRNA^{Lys} anularien els efectes antiproliferatius de C/EBP α , permetent així el creixement dels lipomes. La repressió de PPAR γ podria explicar, en part, la desdiferenciació dels adipòcits. La repressió de la proteïna del retinoblastoma, que de la mateixa manera, ajudaria al manteniment de l'estat proliferatiu d'aquests adipòcits i a l'aparició de trets de teixit adipós marró.⁴⁷⁸ Per últim, un altre aspecte que concorda entre ambdós tipus de lipomes és la repressió de Pref-1, que també podria ser interpretat com un mecanisme per mantenir el fenotip adipós.

En resum, podem dir que els pacients infectats amb HIV-1 i en tractament HAART manifesten alteracions complexes en el teixit adipós, des de lipoatròfia fins a acumulacions de tipus lipomatós la qual cosa es manifesta en alteracions diferencials de l'expressió gènica. En les zones lipoatròfiques, sembla que una inducció local d'estatus proinflamatori juga un paper clau en la manifestació de la pèrdua de teixit adipós i això donaria lloc a una repressió global de l'expressió de gens especialitzats en la funció adipocitària i una inducció de processos com l'apoptosi o la desdiferenciació adipocitària. Tot i manifestar-se aquestes alteracions de forma massiva en els pacients infectats i en HAART, abans del tractament i just degut a la

infecció es produirien ja els primers esdeveniments propis de la inducció del procés proinflamatori i el bloqueig de la diferenciació adipocitària. La toxicitat dels fàrmacs afectaria especialment la component de bloqueig de la funció mitocondrial i potenciarà esdeveniments com la infiltració de macròfags. Aquesta component proinflamatòria seria pròpia de la HALS però no d'altres formes de lipoatròfia com la APL. Per motius que encara desconeixem, en algunes zones anatòmiques específiques (zona dorso-cervical) tot i haver-hi la toxicitat mitocondrial, no es donaria la inducció proinflamatòria i la reacció a la infecció més tractament HAART donaria lloc a una alteració fenotípica del teixit adipós caracteritzada per una elevada proliferació i un cert grau de transformació a fenotip de teixit adipós marró. En aquest cas, aquestes dues característiques són comuns, no obstant, a altres alteracions similars com les que s'observen en malalts amb algunes mutacions del DNA mitocondrial.

En conclusió, el present estudi aporta noves dades en el coneixement de la HALS que poden contribuir a avançar en estratègies per a evitar-la, així com dona idea de la complexitat biològica del teixit adipós humà i la seva capacitat diferencial de resposta a estímuls fisiopatològics.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

1. L'anàlisi de l'expressió gènica de marcadors predeterminats de diverses funcions biològiques al teixit adipós subcutani de pacients infectats per l'HIV-1, indica que existeixen alteracions (disminució de l'adipogènesi, inducció de marcadors d'inflamació, alteració d'alguns transportadors de nucleòsids) abans de l'inici del tractament HAART. A més, el tractament i l'aparició de lipodistròfia accentuen aquestes alteracions i en fan aparèixer algunes d'específiques, com la inducció d'UCP3 i Pref-1.

2. L'augment de citoquines, especialment TNF α , és un dels principals agents potencials desencadenants del conjunt d'alteracions en l'expressió gènica del teixit adipós en els pacients infectats amb HIV-1, i així ho confirmen les dades dels efectes de TNF α sobre els adipòcits humans en cultiu, regulant l'expressió d'alguns transportadors de nucleòsids i marcadors adipogènics.

3. L'anàlisi transcriptòmica global mitjançant "microarrays" de DNA, generalment, confirma les observacions fetes a partir de marcadors preseleccionats i suggereix una aparició seqüencial de les alteracions de funcions biològiques del teixit adipós amb la infecció, el tractament i la subsegüent aparició de lipodistròfia (aparició del procés inflamatori i de primeres alteracions del metabolisme amb la infecció, i aparició significativa d'alteracions mitocondrials amb el tractament). Els nous aspectes identificats per l'anàlisi transcriptòmica serien l'alteració específica de l'apoptosi en els casos en que es dona lipodistròfia, o l'aparició d'alteracions en l'angiogènesi amb el procés d'infecció per l'HIV-1. Així mateix, els processos inflamatoris relacionats amb limfòcits-T o limfòcits-B apareixen amb la infecció, mentre que els associats a macròfags només ho fan amb el tractament, i especialment, amb el desenvolupament posterior de lipodistròfia.

4. El teixit adipós de les "gepes de búfal" en pacients lipodistròfics infectats per l'HIV-1 té un patró d'alteracions diferencials de l'expressió gènica respecte al teixit adipós subcutani dels pacients. Aquestes alteracions serien indicatives d'un cert grau de transformació del fenotip d'adipòcit blanc al d'adipòcit marró, i a més, una adquisició d'elevada capacitat proliferativa. Les alteracions mitocondrials comuns en ambdós teixits no explicarien el seu comportament diferencial, mentre que l'absència d'inflamació local podria explicar, almenys en part, la manca de lipotatròfia en les "gepes de búfal".

Algunes d'aquestes alteracions són comunes en les “gepes de búfal” de pacients amb mutacions del tRNA^{Lys} del DNA mitocondrial (aparició de fenotip marró) mentre que no és així per altres (absència d'alteracions mitocondrials i reducció de marcadors d'adipogènesi).

5. Les alteracions en l'expressió gènica del teixit adipós subcutani en una pacient de lipoatròfia parcial adquirida (síndrome Barraquer-Simons), presenten característiques comuns amb la lipoatròfia perifèrica dels pacients infectats per l'HIV-1, com la reducció en la mitocondriogènesi o l'adipogènesi. Per altra banda, la manca de signes d'inflamació fa pensar que, en aquest cas, el procés inflamatori local no seria essencial per desenvolupar lipoatròfia.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. Unaid. (2006).
2. Hayes, R. & Weiss, H. Epidemiology - Understanding HIV epidemic trends in Africa. *Science* 311, 620 (2006).
3. Keele, B. F. et al. Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1. *Science* 313, 523 (2006).
4. Damond, F. et al. Identification of a highly divergent HIV type 2 and proposal for a change in HIV type 2 classification. *Aids Research and Human Retroviruses* 20, 666 (2004).
5. Santiago, M. L. et al. Simian immunodeficiency virus infection in free-ranging sooty Mangabeys (*Cercocebus atys atys*) from the Tai Forest, Cote d'Ivoire: Implications for the origin of epidemic human immunodeficiency virus type 2. *Journal of Virology* 79, 12515 (2005).
6. Kellam, P. & Weiss, R. A. Infectogenomics: insights from the host genome into infectious diseases. *Cell* 124, 695 (2006).
7. Korber, B. et al. Evolutionary and immunological implications of contemporary HIV-1 variation. *Br.Med Bull.* 58, 19 (2001).
8. Thomson, M. M. & Najera, R. Molecular epidemiology of HIV-1 variants in the global AIDS pandemic: an update. *AIDS Rev.* 7, 210 (2005).
9. Blackard, J. T., Cohen, D. E. & Mayer, K. H. Human immunodeficiency virus superinfection and recombination: current state of knowledge and potential clinical consequences. *Clin.Infect.Dis.* 34, 1108 (2002).
10. Steain, M. C., Wang, B., Dwyer, D. E. & Saksena, N. K. HIV-1 co-infection, superinfection and recombination. *Sex Health* 1, 239 (2004).
11. Gottlieb, G. S. et al. Dual HIV-1 infection associated with rapid disease progression. *Lancet* 363, 619 (2004).
12. Chohan, B., Lavreys, L., Rainwater, S. M. & Overbaugh, J. Evidence for frequent reinfection with human immunodeficiency virus type 1 of a different subtype. *J Virol.* 79, 10701 (2005).
13. van der Kuyl, A. C. et al. Triple HIV-1 infection. *N.Engl.J Med* 352, 2557 (2005).
14. Balasubramanyam, A. et al. Effects of transgenic expression of HIV-1 Vpr on lipid and energy metabolism in mice. *Am J Physiol Endocrinol.Metab* 292, E40 (2007).
15. McCutchan, F. E. et al. In-depth analysis of a heterosexually acquired human immunodeficiency virus type 1 superinfection: evolution, temporal fluctuation, and intercompartment dynamics from the seronegative window period

- through 30 months postinfection. *J Virol.* 79, 11693 (2005).
16. Huang, H., Chopra, R., Verdine, G. L. & Harrison, S. C. Structure of a covalently trapped catalytic complex of HIV-1 reverse transcriptase: implications for drug resistance. *Science* 282, 1669 (1998).
 17. Kohlstaedt, L. A., Wang, J., Friedman, J. M., Rice, P. A. & Steitz, T. A. Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science* 256, 1783 (1992).
 18. Pommier, Y., Johnson, A. A. & Marchand, C. Integrase inhibitors to treat HIV/AIDS. *Nature Reviews Drug Discovery* 4, 236 (2005).
 19. Paillart, J. C., Shehu-Xhilaga, M., Marquet, R. & Mak, J. Dimerization of retroviral RNA genomes: An inseparable pair. *Nature Reviews Microbiology* 2, 461 (2004).
 20. Emerman, M. & Malim, M. H. HIV-1 regulatory/accessory genes: Keys to unraveling viral and host cell biology. *Science* 280, 1880 (1998).
 21. Balabanian, K. et al. CXCR4-tropic HIV-1 envelope glycoprotein functions as a viral chemokine in unstimulated primary CD4⁺ T lymphocytes. *J Immunol.* 173, 7150 (2004).
 22. Cicala, C. et al. HIV envelope induces a cascade of cell signals in non-proliferating target cells that favor virus replication. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* 99, 9380 (2002).
 23. Ray, N. & Doms, R. W. HIV-1 coreceptors and their inhibitors. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 303, 97 (2006).
 24. Kwong, P. D. et al. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* 393, 648 (1998).
 25. Eckert, D. M. & Kim, P. S. Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition. *Annu.Rev.Biochem.* 70, 777 (2001).
 26. Mondor, I., Ugolini, S. & Sattentau, Q. J. Human immunodeficiency virus type 1 attachment to HeLa CD4 cells is CD4 independent and gp120 dependent and requires cell surface heparans. *Journal of Virology* 72, 3623 (1998).
 27. Esser, M. T. et al. Cyanovirin-N binds to gp120 to interfere with CD4-dependent human immunodeficiency virus type 1 virion binding, fusion, and infectivity but does not affect the CD4 binding site on gp120 or soluble CD4-induced conformational changes in gp120. *J.Virol.* 73, 4360 (1999).
 28. Moulard, M. et al. Selective interactions of polyanions with basic surfaces on human immunodeficiency virus type 1 gp120. *Journal of Virology* 74, 1948 (2000).
 29. Balzarini, J. & Van Damme, L. Microbicide drug candidates to prevent HIV infection. *Lancet* 369, 787 (2007).

30. Platt, E. J., Durnin, J. P. & Kabat, D. Kinetic factors control efficiencies of cell entry, efficacies of entry inhibitors, and mechanisms of adaptation of human immunodeficiency virus. *J Virol.* 79, 4347 (2005).
31. Kilby, J. M. et al. Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry. *Nat.Med* 4, 1302 (1998).
32. Ferrer, M. et al. Selection of gp41-mediated HIV-1 cell entry inhibitors from biased combinatorial libraries of non-natural binding elements. *Nat.Struct.Biol.* 6, 953 (1999).
33. Mitchell, R. S. et al. Retroviral DNA integration: ASLV, HIV, and MLV show distinct target site preferences. *PLoS.Biol.* 2, E234 (2004).
34. Schroder, A. R. et al. HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell* 110, 521 (2002).
35. Scherdin, U., Rhodes, K. & Breindl, M. Transcriptionally active genome regions are preferred targets for retrovirus integration. *J Virol.* 64, 907 (1990).
36. Ciuffi, A. et al. A role for LEDGF/p75 in targeting HIV DNA integration. *Nat.Med* 11, 1287 (2005).
37. Turlure, F., Maertens, G., Rahman, S., Cherepanov, P. & Engelman, A. A tripartite DNA-binding element, comprised of the nuclear localization signal and two AT-hook motifs, mediates the association of LEDGF/p75 with chromatin in vivo. *Nucleic Acids Res.* 34, 1653 (2006).
38. Hansen, M. S., Carreau, S., Hoffmann, C., Li, L. & Bushman, F. Retroviral cDNA integration: mechanism, applications and inhibition. *Genet.Eng (N.Y.)* 20, 41 (1998).
39. Wiskerchen, M. & Muesing, M. A. Human immunodeficiency virus type 1 integrase: effects of mutations on viral ability to integrate, direct viral gene expression from unintegrated viral DNA templates, and sustain viral propagation in primary cells. *J Virol.* 69, 376 (1995).
40. Martin-Serrano, J., Zang, T. & Bieniasz, P. D. Role of ESCRT-I in retroviral budding. *J Virol.* 77, 4794 (2003).
41. Bieniasz, P. D. Late budding domains and host proteins in enveloped virus release. *Virology* 344, 55 (2006).
42. Garrus, J. E. et al. Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell* 107, 55 (2001).
43. Haase, A. T. Perils at mucosal front lines for HIV and SIV and their hosts. *Nat.Rev.Immunol.* 5, 783 (2005).
44. McDonald, D. et al. Recruitment of HIV and its receptors to dendritic cell-T cell junctions. *Science* 300, 1295 (2003).

45. Arrighi, J. F. et al. DC-SIGN-mediated infectious synapse formation enhances X4 HIV-1 transmission from dendritic cells to T cells. *J Exp.Med* 200, 1279 (2004).
46. Wiley, R. D. & Gummuluru, S. Immature dendritic cell-derived exosomes can mediate HIV-1 trans infection. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* 103, 738 (2006).
47. Turville, S. G. et al. Immunodeficiency virus uptake, turnover, and 2-phase transfer in human dendritic cells. *Blood* 103, 2170 (2004).
48. Nobile, C. et al. Covert human immunodeficiency virus replication in dendritic cells and in DC-SIGN-expressing transmission to cells promotes long-term lymphocytes. *Journal of Virology* 79, 5386 (2005).
49. Douek, D. C., Picker, L. J. & Koup, R. A. T cell dynamics in HIV-1 infection. *Annual Review of Immunology* 21, 265 (2003).
50. Zhu, T. et al. Genotypic and phenotypic characterization of HIV-1 patients with primary infection. *Science* 261, 1179-81 (1993).
51. De Boer, R. J., Mohri, H., Ho, D. D. & Perelson, A. S. Turnover rates of B cells, T cells, and NK cells in simian immunodeficiency virus-infected and uninfected rhesus macaques. *Journal of Immunology* 170, 2479 (2003).
52. Kulkarni, P. S., Butera, S. T. & Duerr, A. C. Resistance to HIV-1 infection: lessons learned from studies of highly exposed persistently seronegative (HEPS) individuals. *AIDS Rev* 5, 87-103 (2003).
53. Perelson, A. S., Neumann, A. U., Markowitz, M., Leonard, J. M. & Ho, D. D. HIV-1 dynamics in vivo: Virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science* 271, 1582 (1996).
54. Carpenter, C. C. et al. Antiretroviral therapy in adults: updated recommendations of the International AIDS Society-USA Panel. *JAMA* 283, 381 (2000).
55. Li, T. S. et al. Long-lasting recovery in CD4 T-cell function and viral-load reduction after highly active antiretroviral therapy in advanced HIV-1 disease. *Lancet* 351, 1682 (1998).
56. Komanduri, K. V. et al. Restoration of cytomegalovirus-specific CD4(+) T-lymphocyte responses after ganciclovir and highly active antiretroviral therapy in individuals infected with HIV-1. *Nature Medicine* 4, 953 (1998).
57. Spence, R. A., Kati, W. M., Anderson, K. S. & Johnson, K. A. Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by nonnucleoside inhibitors. *Science* 267, 988 (1995).
58. Esnouf, R. et al. Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by non-nucleoside

- inhibitors. *Nat.Struct.Biol.* 2, 303 (1995).
59. Belt, J. A., Marina, N. M., Phelps, D. A. & Crawford, C. R. Nucleoside transport in normal and neoplastic cells. *Adv.Enzyme Regul.* 33, 235 (1993).
60. Griffith, D. A. & Jarvis, S. M. Nucleoside and nucleobase transport systems of mammalian cells. *Biochim.Biophys.Acta* 1286, 153 (1996).
61. Huang, Q. Q. et al. Cloning and functional expression of a complementary DNA encoding a mammalian nucleoside transport protein. *J Biol Chem* 269, 17757 (1994).
62. Che, M., Ortiz, D. F. & Arias, I. M. Primary structure and functional expression of a cDNA encoding the bile canalicular, purine-specific Na⁺-nucleoside cotransporter. *J Biol.Chem.* 270, 13596 (1995).
63. Ritzel, M. W. et al. Molecular identification and characterization of novel human and mouse concentrative Na⁺-nucleoside cotransporter proteins (hCNT3 and mCNT3) broadly selective for purine and pyrimidine nucleosides (system cib). *J Biol Chem* 276, 2914 (2001).
64. Ritzel, M. W. et al. Molecular cloning and functional expression of cDNAs encoding a human Na⁺-nucleoside cotransporter (hCNT1). *Am J Physiol* 272, 707 (1997).
65. Wang, J. et al. Na⁺-dependent purine nucleoside transporter from human kidney: cloning and functional characterization. *Am J Physiol* 273, 1058 (1997).
66. Valdes, R. et al. Nutritional regulation of nucleoside transporter expression in rat small intestine. *Gastroenterology* 119, 1623 (2000).
67. Soler, C. et al. Macrophages require different nucleoside transport systems for proliferation and activation. *FASEB J* 15, 1979 (2001).
68. Soler, C. et al. Lipopolysaccharide-induced apoptosis of macrophages determines the up-regulation of concentrative nucleoside transporters Cnt1 and Cnt2 through tumor necrosis factor-alpha-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem* 276, 30043 (2001).
69. Lostao, M. P. et al. Electrogenic uptake of nucleosides and nucleoside-derived drugs by the human nucleoside transporter 1 (hCNT1) expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *FEBS Lett* 481, 137 (2000).
70. Chandrasena, G., Giltay, R., Patil, S. D., Bakken, A. & Unadkat, J. D. Functional expression of human intestinal Na⁺-dependent and Na⁺-independent nucleoside transporters in *Xenopus laevis* oocytes. *Biochem Pharmacol* 53, 1909 (1997).
71. Ritzel, M. W. et al. Molecular cloning, functional expression and chromosomal localization of a

- cDNA encoding a human Na⁺/nucleoside cotransporter (hCNT2) selective for purine nucleosides and uridine. *Mol Membr Biol* 15, 203 (1998).
72. Larrayoz, I. M., Casado, F. J., Pastor-Anglada, M. & Lostao, M. P. Electrophysiological characterization of the human Na⁽⁺⁾/nucleoside cotransporter 1 (hCNT1) and role of adenosine on hCNT1 function. *J Biol Chem* 279, 8999 (2004).
73. Smith, K. M. et al. Electrophysiological characterization of a recombinant human Na⁺-coupled nucleoside transporter (hCNT1) produced in *Xenopus* oocytes. *J Physiol* 558, 807 (2004).
74. Griffiths, M. et al. Cloning of a human nucleoside transporter implicated in the cellular uptake of adenosine and chemotherapeutic drugs. *Nat. Med* 3, 89 (1997).
75. Griffiths, M. et al. Molecular cloning and characterization of a nitrobenzylthioinosine-insensitive (ei) equilibrative nucleoside transporter from human placenta. *Biochem. J* 328 (Pt 3), 739 (1997).
76. Crawford, C. R., Patel, D. H., Naeve, C. & Belt, J. A. Cloning of the human equilibrative, nitrobenzylmercaptapurine riboside (NBMPR)-insensitive nucleoside transporter ei by functional expression in a transport-deficient cell line. *J Biol. Chem.* 273, 5288 (1998).
77. Baldwin, S. A. et al. The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29. *Pflugers Arch* 447, 735 (2004).
78. Ward, J. L., Sherali, A., Mo, Z. P. & Tse, C. M. Kinetic and pharmacological properties of cloned human equilibrative nucleoside transporters, ENT1 and ENT2, stably expressed in nucleoside transporter-deficient PK15 cells. Ent2 exhibits a low affinity for guanosine and cytidine but a high affinity for inosine. *J Biol Chem* 275, 8375 (2000).
79. Soler, C. et al. Interferon-gamma regulates nucleoside transport systems in macrophages through signal transduction and activator of transduction factor 1 (STAT1)-dependent and -independent signalling pathways. *Biochem J* 375, 777 (2003).
80. del Santo, B. et al. Differential expression and regulation of nucleoside transport systems in rat liver parenchymal and hepatoma cells. *Hepatology* 28, 1504 (1998).
81. Pastor-Anglada, M. et al. Complex regulation of nucleoside transporter expression in epithelial and immune system cells. *Mol Membr Biol* 18, 81 (2001).
82. Pastor-Anglada, M. et al. Nucleoside transporters and liver cell growth. *Biochemistry and Cell Biology-Biochimie et Biologie Cellulaire* 76, 771 (1998).
83. Dragan, Y. et al. Selective loss of nucleoside carrier expression in rat

- hepatocarcinomas. *Hepatology* 32, 239 (2000).
84. Fernandez-Veledo, S., Valdes, R., Wallenius, V., Casado, F. J. & Pastor-Anglada, M. Up-regulation of the high-affinity pyrimidine-preferring nucleoside transporter concentrative nucleoside transporter 1 by tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in liver parenchymal cells. *Journal of Hepatology* 41, 538 (2004).
85. Duflot, S. et al. ATP-sensitive K(+) channels regulate the concentrative adenosine transporter CNT2 following activation by A(1) adenosine receptors. *Mol Cell Biol* 24, 2710 (2004).
86. Kershaw, E. E. & Flier, J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 89, 2548 (2004).
87. Siiteri, P. K. Adipose tissue as a source of hormones. *Am J Clin Nutr* 45, 277-82 (1987).
88. Flier, J. S., Cook, K. S., Usher, P. & Spiegelman, B. M. Severely impaired adiponectin expression in genetic and acquired obesity. *Science* 237, 405-8 (1987).
89. Zhang, Y. et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372, 425-32 (1994).
90. Timchenko, N. A. et al. CCAAT/enhancer binding protein alpha regulates p21 protein and hepatocyte proliferation in newborn mice. *Mol Cell Biol* 17, 7353-61 (1997).
91. Klein, S. et al. Leptin production during early starvation in lean and obese women. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278, E280-4 (2000).
92. Coleman, R. A. & Herrmann, T. S. Nutritional regulation of leptin in humans. *Diabetologia* 42, 639-46 (1999).
93. Hilton, L. K. & Loucks, A. B. Low energy availability, not exercise stress, suppresses the diurnal rhythm of leptin in healthy young women. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278, E43-9 (2000).
94. Fain, J. N., Madan, A. K., Hiler, M. L., Cheema, P. & Bahouth, S. W. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology* 145, 2273-82 (2004).
95. Felipe, F., Mercader, J., Ribot, J., Palou, A. & Bonet, M. L. Effects of retinoic acid administration and dietary vitamin A supplementation on leptin expression in mice: lack of correlation with changes of adipose tissue mass and food intake. *Biochim Biophys Acta* 1740, 258-65 (2005).
96. Friedman, J. M. & Halaas, J. L. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395, 763-70 (1998).
97. Fried, S. K., Bunkin, D. A. & Greenberg, A. S. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by

- glucocorticoid. *J Clin Endocrinol Metab* 83, 847-50 (1998).
98. Fernandez-Real, J. M., Broch, M., Vendrell, J. & Ricart, W. Insulin resistance, inflammation, and serum fatty acid composition. *Diabetes Care* 26, 1362-8 (2003).
99. Ruan, H. & Lodish, H. F. Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects of tumor necrosis factor-alpha. *Cytokine Growth Factor Rev* 14, 447-55 (2003).
100. Hotamisligil, G. S., Shargill, N. S. & Spiegelman, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259, 87-91 (1993).
101. Ruan, H. et al. Profiling gene transcription in vivo reveals adipose tissue as an immediate target of tumor necrosis factor-alpha: implications for insulin resistance. *Diabetes* 51, 3176-88 (2002).
102. Miki, H. et al. Essential role of insulin receptor substrate 1 (IRS-1) and IRS-2 in adipocyte differentiation. *Mol Cell Biol* 21, 2521-32 (2001).
103. Hotamisligil, G. S. Inflammatory pathways and insulin action. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27 Suppl 3, S53-5 (2003).
104. Prins, J. B. et al. Tumor necrosis factor-alpha induces apoptosis of human adipose cells. *Diabetes* 46, 1939-44 (1997).
105. Petruschke, T. & Hauner, H. Tumor necrosis factor-alpha prevents the differentiation of human adipocyte precursor cells and causes delipidation of newly developed fat cells. *J Clin Endocrinol Metab* 76, 742-7 (1993).
106. Xing, H. et al. TNF alpha-mediated inhibition and reversal of adipocyte differentiation is accompanied by suppressed expression of PPARgamma without effects on Pref-1 expression. *Endocrinology* 138, 2776-83 (1997).
107. Chandran, M., Phillips, S. A., Ciaraldi, T. & Henry, R. R. Adiponectin: more than just another fat cell hormone? *Diabetes Care* 26, 2442-50 (2003).
108. Yamauchi, T. et al. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 423, 762-9 (2003).
109. Duplus, E. & Forest, C. Is there a single mechanism for fatty acid regulation of gene transcription? *Biochem Pharmacol* 64, 893-901 (2002).
110. Holcomb, I. N. et al. FIZZ1, a novel cysteine-rich secreted protein associated with pulmonary inflammation, defines a new gene family. *Embo J* 19, 4046-55 (2000).
111. Steppan, C. M. et al. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 409, 307-12 (2001).
112. Patel, S. D., Rajala, M. W., Rossetti, L., Scherer, P. E. & Shapiro, L. Disulfide-dependent multimeric assembly of resistin family

- hormones. *Science* 304, 1154-8 (2004).
113. Kusminski, C. M., McTernan, P. G. & Kumar, S. Role of resistin in obesity, insulin resistance and Type II diabetes. *Clin Sci (Lond)* 109, 243-56 (2005).
114. Kaser, S. et al. Resistin messenger-RNA expression is increased by proinflammatory cytokines in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 309, 286-90 (2003).
115. Lehrke, M. et al. An inflammatory cascade leading to hyperresistinemia in humans. *PLoS Med* 1, e45 (2004).
116. Bajaj, M., Suraamornkul, S., Hardies, L. J., Pratipanawat, T. & DeFronzo, R. A. Plasma resistin concentration, hepatic fat content, and hepatic and peripheral insulin resistance in pioglitazone-treated type II diabetic patients. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28, 783-9 (2004).
117. Felipe, F., Bonet, M. L., Ribot, J. & Palou, A. Modulation of resistin expression by retinoic acid and vitamin A status. *Diabetes* 53, 882-9 (2004).
118. Silswal, N. et al. Human resistin stimulates the pro-inflammatory cytokines TNF-alpha and IL-12 in macrophages by NF-kappaB-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 334, 1092-101 (2005).
119. Savage, D. B. et al. Resistin / Fizz3 expression in relation to obesity and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma action in humans. *Diabetes* 50, 2199-202 (2001).
120. McTernan, C. L. et al. Resistin, central obesity, and type 2 diabetes. *Lancet* 359, 46-7 (2002).
121. Utzschneider, K. M. et al. Resistin is not associated with insulin sensitivity or the metabolic syndrome in humans. *Diabetologia* 48, 2330-3 (2005).
122. Kawanami, D. et al. Direct reciprocal effects of resistin and adiponectin on vascular endothelial cells: a new insight into adipocytokine-endothelial cell interactions. *Biochem Biophys Res Commun* 314, 415-9 (2004).
123. Gregoire, F. M., Smas, C. M. & Sul, H. S. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev* 78, 783-809 (1998).
124. Adams, M. et al. Activators of peroxisome proliferator-activated receptor gamma have depot-specific effects on human preadipocyte differentiation. *J Clin Invest* 100, 3149-53 (1997).
125. Lefebvre, A. M. et al. Depot-specific differences in adipose tissue gene expression in lean and obese subjects. *Diabetes* 47, 98-103 (1998).
126. Djian, P., Roncari, D. A. & Hollenberg, C. H. Adipocyte precursor clones vary in capacity for differentiation. *Metabolism* 34, 880-3 (1985).
127. Ostman, J., Arner, P., Engfeldt, P. & Kager, L. Regional differences in the control of lipolysis in human

- adipose tissue. *Metabolism* 28, 1198-205 (1979).
128. Morimoto, C., Tsujita, T. & Okuda, H. Norepinephrine-induced lipolysis in rat fat cells from visceral and subcutaneous sites: role of hormone-sensitive lipase and lipid droplets. *J Lipid Res* 38, 132-8 (1997).
129. MacDougald, O. A. & Lane, M. D. Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation. *Annu Rev Biochem* 64, 345-73 (1995).
130. Darlington, G. J., Ross, S. E. & MacDougald, O. A. The role of C/EBP genes in adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 273, 30057-60 (1998).
131. Spiegelman, B. M., Choy, L., Hotamisligil, G. S., Graves, R. A. & Tontonoz, P. Regulation of adipocyte gene expression in differentiation and syndromes of obesity/diabetes. *J Biol Chem* 268, 6823 (1993).
132. Kubota, N. et al. PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol Cell* 4, 597-609 (1999).
133. Rosen, E. D. et al. PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol Cell* 4, 611-7 (1999).
134. Wu, Z. et al. Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Mol Cell* 3, 151-8 (1999).
135. Lekstrom-Himes, J. & Xanthopoulos, K. G. Biological role of the CCAAT/enhancer-binding protein family of transcription factors. *J Biol Chem* 273, 28545-8 (1998).
136. Yeh, W. C., Cao, Z., Classon, M. & McKnight, S. L. Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three members of the C/EBP family of leucine zipper proteins. *Genes Dev* 9, 168-81 (1995).
137. Wu, Z., Xie, Y., Bucher, N. L. & Farmer, S. R. Conditional ectopic expression of C/EBP beta in NIH-3T3 cells induces PPAR gamma and stimulates adipogenesis. *Genes Dev* 9, 2350-63 (1995).
138. Tanaka, T., Yoshida, N., Kishimoto, T. & Akira, S. Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBPbeta and/or C/EBPdelta gene. *Embo J* 16, 7432-43 (1997).
139. Lin, F. T. & Lane, M. D. CCAAT/enhancer binding protein alpha is sufficient to initiate the 3T3-L1 adipocyte differentiation program. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 8757-61 (1994).
140. Freytag, S. O., Paielli, D. L. & Gilbert, J. D. Ectopic expression of the CCAAT/enhancer-binding protein alpha promotes the adipogenic program in a variety of mouse fibroblastic cells. *Genes Dev* 8, 1654-63 (1994).
141. Umek, R. M., Friedman, A. D. & McKnight, S. L. CCAAT-enhancer binding protein: a component of a differentiation switch. *Science* 251, 288-92 (1991).

142. Wang, N. D. et al. Impaired energy homeostasis in C/EBP alpha knockout mice. *Science* 269, 1108-12 (1995).
143. Linhart, H. G. et al. C/EBPalpha is required for differentiation of white, but not brown, adipose tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 12532-7 (2001).
144. Carmona, M. C. et al. Mitochondrial biogenesis and thyroid status maturation in brown fat require CCAAT/enhancer-binding protein alpha. *J Biol Chem* 277, 21489-98 (2002).
145. Kim, J. B. et al. Dual DNA binding specificity of ADD1/SREBP1 controlled by a single amino acid in the basic helix-loop-helix domain. *Mol Cell Biol* 15, 2582-8 (1995).
146. Tontonoz, P., Kim, J. B., Graves, R. A. & Spiegelman, B. M. ADD1: a novel helix-loop-helix transcription factor associated with adipocyte determination and differentiation. *Mol Cell Biol* 13, 4753-9 (1993).
147. Brown, M. S. & Goldstein, J. L. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* 89, 331-40 (1997).
148. Kim, J. B. et al. Nutritional and insulin regulation of fatty acid synthetase and leptin gene expression through ADD1/SREBP1. *J Clin Invest* 101, 1-9 (1998).
149. Kim, J. B. & Spiegelman, B. M. ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. *Genes Dev* 10, 1096-107 (1996).
150. Fajas, L. et al. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression by adipocyte differentiation and determination factor 1/sterol regulatory element binding protein 1: implications for adipocyte differentiation and metabolism. *Mol Cell Biol* 19, 5495-503 (1999).
151. Kim, J. B., Wright, H. M., Wright, M. & Spiegelman, B. M. ADD1/SREBP1 activates PPARgamma through the production of endogenous ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4333-7 (1998).
152. Mukherjee, R., Jow, L., Croston, G. E. & Paterniti, J. R., Jr. Identification, characterization, and tissue distribution of human peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) isoforms PPARgamma2 versus PPARgamma1 and activation with retinoid X receptor agonists and antagonists. *J. Biol. Chem.* 272, 8071 (1997).
153. Tontonoz, P., Hu, E. & Spiegelman, B. M. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* 79, 1147-56 (1994).
154. Barak, Y. et al. PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol Cell* 4, 585-95 (1999).

155. Tontonoz, P., Hu, E., Devine, J., Beale, E. G. & Spiegelman, B. M. PPAR gamma 2 regulates adipose expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *Mol Cell Biol* 15, 351-7 (1995).
156. Devine, J. H. et al. Adipose expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase promoter requires peroxisome proliferator-activated receptor gamma and 9-cis-retinoic acid receptor binding to an adipocyte-specific enhancer in vivo. *J Biol Chem* 274, 13604-12 (1999).
157. Lehmann, J. M. et al. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem* 270, 12953-6 (1995).
158. Sandouk, T., Reda, D. & Hofmann, C. Antidiabetic agent pioglitazone enhances adipocyte differentiation of 3T3-F442A cells. *Am J Physiol* 264, C1600-8 (1993).
159. Kletzien, R. F., Clarke, S. D. & Ulrich, R. G. Enhancement of adipocyte differentiation by an insulin-sensitizing agent. *Mol Pharmacol* 41, 393-8 (1992).
160. Forman, B. M. et al. 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell* 83, 803-12 (1995).
161. Kliewer, S. A. et al. A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell* 83, 813-9 (1995).
162. Forman, B. M., Chen, J. & Evans, R. M. Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 4312-7 (1997).
163. Kliewer, S. A. et al. Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 4318-23 (1997).
164. Villarroya, F., Giralt, M. & Iglesias, R. Retinoids and adipose tissues: metabolism, cell differentiation and gene expression. *Int J Obes Relat Metab Disord* 23, 1-6 (1999).
165. Mangelsdorf, D. J. & Evans, R. M. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 83, 841-50 (1995).
166. Li, D., Li, T., Wang, F., Tian, H. & Samuels, H. H. Functional evidence for retinoid X receptor (RXR) as a nonsilent partner in the thyroid hormone receptor/RXR heterodimer. *Mol Cell Biol* 22, 5782-92 (2002).
167. Schulman, I. G., Shao, G. & Heyman, R. A. Transactivation by retinoid X receptor-peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) heterodimers: intermolecular synergy requires only the PPARgamma hormone-dependent activation function. *Mol Cell Biol* 18, 3483-94 (1998).

168. Tontonoz, P. et al. Terminal differentiation of human liposarcoma cells induced by ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and the retinoid X receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 237-41 (1997).
169. Schluter, A., Barbera, M. J., Iglesias, R., Giralt, M. & Villarroya, F. Phytanic acid, a novel activator of uncoupling protein-1 gene transcription and brown adipocyte differentiation. *Biochem J* 362, 61-9 (2002).
170. Schluter, A., Giralt, M., Iglesias, R. & Villarroya, F. Phytanic acid, but not pristanic acid, mediates the positive effects of phytol derivatives on brown adipocyte differentiation. *FEBS Lett* 517, 83-6 (2002).
171. Hauner, H. et al. Promoting effect of glucocorticoids on the differentiation of human adipocyte precursor cells cultured in a chemically defined medium. *J Clin Invest* 84, 1663-70 (1989).
172. Wiederer, O. & Loffler, G. Hormonal regulation of the differentiation of rat adipocyte precursor cells in primary culture. *J Lipid Res* 28, 649-58 (1987).
173. Xia, X. & Serrero, G. Inhibition of adipose differentiation by phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors. *J Cell Physiol* 178, 9-16 (1999).
174. Sakaue, H. et al. Posttranscriptional control of adipocyte differentiation through activation of phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem* 273, 28945-52 (1998).
175. Gaillard, D., Negrel, R., Lagarde, M. & Ailhaud, G. Requirement and role of arachidonic acid in the differentiation of pre-adipose cells. *Biochem J* 257, 389-97 (1989).
176. Diascro, D. D., Jr. et al. High fatty acid content in rabbit serum is responsible for the differentiation of osteoblasts into adipocyte-like cells. *J Bone Miner Res* 13, 96-106 (1998).
177. Aubert, J. et al. Prostacyclin IP receptor up-regulates the early expression of C/EBPbeta and C/EBPdelta in preadipose cells. *Mol Cell Endocrinol* 160, 149-56 (2000).
178. Brun, R. P. et al. Differential activation of adipogenesis by multiple PPAR isoforms. *Genes Dev* 10, 974-84 (1996).
179. Ailhaud, G. Cross talk between adipocytes and their precursors: relationships with adipose tissue development and blood pressure. *Ann N Y Acad Sci* 892, 127-33 (1999).
180. Joyner, J. M., Hutley, L. J. & Cameron, D. P. Glucocorticoid receptors in human preadipocytes: regional and gender differences. *J Endocrinol* 166, 145-52 (2000).
181. Cao, Z., Umek, R. M. & McKnight, S. L. Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes Dev* 5, 1538-52 (1991).
182. Wu, Z., Bucher, N. L. & Farmer, S. R. Induction of peroxisome proliferator-activated receptor gamma during the conversion of

- 3T3 fibroblasts into adipocytes is mediated by C/EBPbeta, C/EBPdelta, and glucocorticoids. *Mol Cell Biol* 16, 4128-36 (1996).
183. Napolitano, A., Voice, M. W., Edwards, C. R., Seckl, J. R. & Chapman, K. E. 11Beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1 in adipocytes: expression is differentiation-dependent and hormonally regulated. *J Steroid Biochem Mol Biol* 64, 251-60 (1998).
184. Williams, L. J. et al. C/EBP regulates hepatic transcription of 11beta -hydroxysteroid dehydrogenase type 1. A novel mechanism for cross-talk between the C/EBP and glucocorticoid signaling pathways. *J Biol Chem* 275, 30232-9 (2000).
185. Livingstone, D. E. et al. Understanding the role of glucocorticoids in obesity: tissue-specific alterations of corticosterone metabolism in obese Zucker rats. *Endocrinology* 141, 560-3 (2000).
186. Rask, E. et al. Tissue-specific dysregulation of cortisol metabolism in human obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 1418-21 (2001).
187. Bujalska, I. J., Kumar, S. & Stewart, P. M. Does central obesity reflect "Cushing's disease of the omentum"? *Lancet* 349, 1210-3 (1997).
188. Dimaculangan, D. D., Chawla, A., Boak, A., Kagan, H. M. & Lazar, M. A. Retinoic acid prevents downregulation of ras reversion gene/lysyl oxidase early in adipocyte differentiation. *Differentiation* 58, 47-52 (1994).
189. Suryawan, A. & Hu, C. Y. Effect of retinoic acid on differentiation of cultured pig preadipocytes. *J Anim Sci* 75, 112-7 (1997).
190. Stone, R. L. & Bernlohr, D. A. The molecular basis for inhibition of adipose conversion of murine 3T3-L1 cells by retinoic acid. *Differentiation* 45, 119-27 (1990).
191. Safonova, I. et al. Retinoids are positive effectors of adipose cell differentiation. *Mol Cell Endocrinol* 104, 201-11 (1994).
192. Dani, C. et al. Differentiation of embryonic stem cells into adipocytes in vitro. *J Cell Sci* 110 (Pt 11), 1279-85 (1997).
193. Vernochet, C. et al. PPARgamma-dependent and PPARgamma-independent effects on the development of adipose cells from embryonic stem cells. *FEBS Lett* 510, 94-8 (2002).
194. Sul, H. S., Smas, C., Mei, B. & Zhou, L. Function of pref-1 as an inhibitor of adipocyte differentiation. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24 Suppl 4, S15-9 (2000).
195. Mei, B., Zhao, L., Chen, L. & Sul, H. S. Only the large soluble form of preadipocyte factor-1 (Pref-1), but not the small soluble and membrane forms, inhibits adipocyte differentiation: role of alternative

- splicing. *Biochem J* 364, 137-44 (2002).
196. Cadigan, K. M. & Nusse, R. Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev* 11, 3286-305 (1997).
197. Ross, S. E. et al. Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. *Science* 289, 950-3 (2000).
198. Aratani, Y., Sugimoto, E. & Kitagawa, Y. Lithium ion reversibly inhibits inducer-stimulated adipose conversion of 3T3-L1 cells. *FEBS Lett* 218, 47-51 (1987).
199. Wabitsch, M., Hauner, H., Heinze, E. & Teller, W. M. The role of growth hormone/insulin-like growth factors in adipocyte differentiation. *Metabolism* 44, 45-9 (1995).
200. Scacchi, M., Pincelli, A. I. & Cavagnini, F. Growth hormone in obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 23, 260-71 (1999).
201. Gregoire, F. et al. Interferon-gamma and interleukin-1 beta inhibit adipogenesis in cultured rodent preadipocytes. *J Cell Physiol* 151, 300-9 (1992).
202. Ohsumi, J. et al. Regulation of lipoprotein lipase synthesis in 3T3-L1 adipocytes by interleukin-11/adipogenesis inhibitory factor. *Biochem Mol Biol Int* 32, 705-12 (1994).
203. Ohsumi, J. et al. Troglitazone prevents the inhibitory effects of inflammatory cytokines on insulin-induced adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *Endocrinology* 135, 2279-82 (1994).
204. Choy, L., Skillington, J. & Derynck, R. Roles of autocrine TGF-beta receptor and Smad signaling in adipocyte differentiation. *J Cell Biol* 149, 667-82 (2000).
205. Serrero, G., Lepak, N. M. & Goodrich, S. P. Paracrine regulation of adipose differentiation by arachidonate metabolites: prostaglandin F2 alpha inhibits early and late markers of differentiation in the adipogenic cell line 1246. *Endocrinology* 131, 2545-51 (1992).
206. Nedergaard, J. et al. UCP1: the only protein able to mediate adaptive non-shivering thermogenesis and metabolic inefficiency. *Biochim Biophys Acta* 1504, 82-106 (2001).
207. Cannon, B. & Nedergaard, J. Brown adipose tissue thermogenesis in neonatal and cold-adapted animals. *Biochem Soc Trans* 14, 233-6 (1986).
208. Nedergaard, J. & Cannon, B. (ed. Guilles, R.) 502 (Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, 1985).
209. Nicholls, D. G. & Locke, R. M. Thermogenic mechanisms in brown fat. *Physiol Rev* 64, 1-64 (1984).
210. Ricquier, D. & Kader, J. C. Mitochondrial protein alteration in active brown fat: a sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoretic study. *Biochem Biophys Res Commun* 73, 577-83 (1976).

211. Lin, C. S. & Klingenberg, M. Characteristics of the isolated purine nucleotide binding protein from brown fat mitochondria. *Biochemistry* 21, 2950-6 (1982).
212. Fleury, C. et al. Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nat Genet* 15, 269-72 (1997).
213. Enerback, S. et al. Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese. *Nature* 387, 90-4 (1997).
214. Lowell, B. B. et al. Development of obesity in transgenic mice after genetic ablation of brown adipose tissue. *Nature* 366, 740-2 (1993).
215. Himms-Hagen, J., Hogan, S. & Zaror-Behrens, G. Increased brown adipose tissue thermogenesis in obese (ob/ob) mice fed a palatable diet. *Am J Physiol* 250, E274-81 (1986).
216. Rothwell, N. J. & Stock, M. J. Influence of environmental temperature on energy balance, diet-induced thermogenesis and brown fat activity in 'cafeteria'-fed rats. *Br J Nutr* 56, 123-9 (1986).
217. Glick, Z., Teague, R. J. & Bray, G. A. Brown adipose tissue: thermic response increased by a single low protein, high carbohydrate meal. *Science* 213, 1125-7 (1981).
218. Champigny, O. & Ricquier, D. Effects of fasting and refeeding on the level of uncoupling protein mRNA in rat brown adipose tissue: evidence for diet-induced and cold-induced responses. *J Nutr* 120, 1730-6 (1990).
219. Trayhurn, P. & Jennings, G. Evidence that fasting can induce a selective loss of uncoupling protein from brown adipose tissue mitochondria of mice. *Biosci Rep* 6, 805-10 (1986).
220. Villarroya, F., Felipe, A. & Mampel, T. Brown adipose tissue activity in hypocaloric-diet fed lactating rats. *Biosci Rep* 6, 669-75 (1986).
221. Nedergaard, J., Herron, D., Jacobsson, A., Rehnmark, S. & Cannon, B. Norepinephrine as a morphogen? its unique interaction with brown adipose tissue. *Int J Dev Biol* 39, 827-37 (1995).
222. Cannon, B. & Nedergaard, J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 84, 277 (2004).
223. Thonberg, H., Fredriksson, J. M., Nedergaard, J. & Cannon, B. A novel pathway for adrenergic stimulation of cAMP-response-element-binding protein (CREB) phosphorylation: mediation via alpha 1-adrenoceptors and protein kinase C activation. *Biochem J* 364, 73-9 (2002).
224. Ricquier, D. et al. Expression of uncoupling protein mRNA in thermogenic or weakly thermogenic brown adipose tissue. Evidence for a rapid beta-adrenoreceptor-mediated and transcriptionally regulated step during activation of thermogenesis. *J Biol Chem* 261, 13905-10 (1986).

225. Kopecky, J. et al. Synthesis of mitochondrial uncoupling protein in brown adipocytes differentiated in cell culture. *J Biol Chem* 265, 22204-9 (1990).
226. Rehnmark, S., Nechad, M., Herron, D., Cannon, B. & Nedergaard, J. Alpha- and beta-adrenergic induction of the expression of the uncoupling protein thermogenin in brown adipocytes differentiated in culture. *J Biol Chem* 265, 16464-71 (1990).
227. Puigserver, P. et al. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* 92, 829-39 (1998).
228. Rehnmark, S., Antonson, P., Xanthopoulos, K. G. & Jacobsson, A. Differential adrenergic regulation of C/EBP alpha and C/EBP beta in brown adipose tissue. *FEBS Lett* 318, 235-41 (1993).
229. Bronnikov, G., Houstek, J. & Nedergaard, J. Beta-adrenergic, cAMP-mediated stimulation of proliferation of brown fat cells in primary culture. Mediation via beta 1 but not via beta 3 adrenoceptors. *J Biol Chem* 267, 2006-13 (1992).
230. Nanberg, E. & Nedergaard, J. Alpha 1-adrenergic inositol trisphosphate production in brown adipocytes is Na⁺ dependent. *Biochim Biophys Acta* 930, 438-45 (1987).
231. Wilcke, M. & Nedergaard, J. Alpha 1- and beta-adrenergic regulation of intracellular Ca²⁺ levels in brown adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 163, 292-300 (1989).
232. Raasmaja, A., Mohell, N. & Nedergaard, J. Increased alpha 1-adrenergic receptor density in brown adipose tissue of cafeteria-fed rats. *Biosci Rep* 4, 851-9 (1984).
233. Boss, O. et al. Role of the beta(3)-adrenergic receptor and/or a putative beta(4)-adrenergic receptor on the expression of uncoupling proteins and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1. *Biochem Biophys Res Commun* 261, 870-6 (1999).
234. Gomez-Ambrosi, J., Fruhbeck, G. & Martinez, J. A. Rapid in vivo PGC-1 mRNA upregulation in brown adipose tissue of Wistar rats by a beta(3)-adrenergic agonist and lack of effect of leptin. *Mol Cell Endocrinol* 176, 85-90 (2001).
235. Wu, Z. et al. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* 98, 115-24 (1999).
236. Michael, L. F. et al. Restoration of insulin-sensitive glucose transporter (GLUT4) gene expression in muscle cells by the transcriptional coactivator PGC-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 3820-5 (2001).
237. Puigserver, P. et al. Cytokine stimulation of energy expenditure through p38 MAP kinase activation of PPARgamma coactivator-1. *Mol. Cell* 8, 971 (2001).
238. Tiraby, C. et al. Acquisition of brown fat cell features by human white adipocytes. *J Biol Chem* 278, 33370-6 (2003).

239. Bianco, A. C. & Silva, J. E. Intracellular conversion of thyroxine to triiodothyronine is required for the optimal thermogenic function of brown adipose tissue. *J Clin Invest* 79, 295-300 (1987).
240. Fernandez, J. A., Mampel, T., Villarroya, F. & Iglesias, R. Direct assessment of brown adipose tissue as a site of systemic tri-iodothyronine production in the rat. *Biochem J* 243, 281-4 (1987).
241. Ross, S. R. et al. Hibernoma formation in transgenic mice and isolation of a brown adipocyte cell line expressing the uncoupling protein gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 7561-5 (1992).
242. Raasmaja, A. & Larsen, P. R. Alpha 1- and beta-adrenergic agents cause synergistic stimulation of the iodothyronine deiodinase in rat brown adipocytes. *Endocrinology* 125, 2502-9 (1989).
243. Hernandez, A. & Obregon, M. J. Triiodothyronine amplifies the adrenergic stimulation of uncoupling protein expression in rat brown adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278, E769-77 (2000).
244. Cassard-Doulcier, A. M. et al. In vitro interactions between nuclear proteins and uncoupling protein gene promoter reveal several putative transactivating factors including Ets1, retinoid X receptor, thyroid hormone receptor, and a CACCC box-binding protein. *J Biol Chem* 269, 24335-42 (1994).
245. Rabelo, R., Reyes, C., Schifman, A. & Silva, J. E. Interactions among receptors, thyroid hormone response elements, and ligands in the regulation of the rat uncoupling protein gene expression by thyroid hormone. *Endocrinology* 137, 3478-87 (1996).
246. Rabelo, R., Schifman, A., Rubio, A., Sheng, X. & Silva, J. E. Delineation of thyroid hormone-responsive sequences within a critical enhancer in the rat uncoupling protein gene. *Endocrinology* 136, 1003-13 (1995).
247. De Luca, L. M. Retinoids and their receptors in differentiation, embryogenesis, and neoplasia. *Faseb J* 5, 2924-33 (1991).
248. Leid, M., Kastner, P. & Chambon, P. Multiplicity generates diversity in the retinoic acid signalling pathways. *Trends Biochem Sci* 17, 427-33 (1992).
249. Villarroya, F., Iglesias, R. & Giralt, M. Retinoids and retinoid receptors in the control of energy balance: novel pharmacological strategies in obesity and diabetes. *Curr Med Chem* 11, 795-805 (2004).
250. Tsutsumi, C. et al. Retinoids and retinoid-binding protein expression in rat adipocytes. *J Biol Chem* 267, 1805-10 (1992).
251. Wei, S. et al. Retinyl ester hydrolysis and retinol efflux from BFC-1beta adipocytes. *J Biol Chem* 272, 14159-65 (1997).
252. Kurlandsky, S. B., Gamble, M. V., Ramakrishnan, R. & Blaner, W. S.

- Plasma delivery of retinoic acid to tissues in the rat. *J Biol Chem* 270, 17850-7 (1995).
253. Kuri-Harcuch, W. Differentiation of 3T3-F442A cells into adipocytes is inhibited by retinoic acid. *Differentiation* 23, 164-9 (1982).
254. Chawla, A. & Lazar, M. A. Peroxisome proliferator and retinoid signaling pathways co-regulate preadipocyte phenotype and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 1786-90 (1994).
255. Skillington, J., Choy, L. & Derynck, R. Bone morphogenetic protein and retinoic acid signaling cooperate to induce osteoblast differentiation of preadipocytes. *J Cell Biol* 159, 135-46 (2002).
256. Xue, J. C., Schwarz, E. J., Chawla, A. & Lazar, M. A. Distinct stages in adipogenesis revealed by retinoid inhibition of differentiation after induction of PPARgamma. *Mol Cell Biol* 16, 1567-75 (1996).
257. Kamei, Y., Kawada, T., Kazuki, R. & Sugimoto, E. Retinoic acid receptor gamma 2 gene expression is up-regulated by retinoic acid in 3T3-L1 preadipocytes. *Biochem J* 293 (Pt 3), 807-12 (1993).
258. Shao, D. & Lazar, M. A. Peroxisome proliferator activated receptor gamma, CCAAT/enhancer-binding protein alpha, and cell cycle status regulate the commitment to adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 272, 21473-8 (1997).
259. Schwarz, E. J., Reginato, M. J., Shao, D., Krakow, S. L. & Lazar, M. A. Retinoic acid blocks adipogenesis by inhibiting C/EBPbeta-mediated transcription. *Mol Cell Biol* 17, 1552-61 (1997).
260. Hida, Y., Kawada, T., Kayahashi, S., Ishihara, T. & Fushiki, T. Counteraction of retinoic acid and 1,25-dihydroxyvitamin D3 on up-regulation of adipocyte differentiation with PPARgamma ligand, an antidiabetic thiazolidinedione, in 3T3-L1 cells. *Life Sci* 62, PL205-11 (1998).
261. Teboul, M. et al. Retinoic acid decreases nuclear triiodothyronine receptor expression and impairs an early step of adipose differentiation in the thyroid hormone-sensitive mouse Ob 17 preadipocyte cell line. *Endocrinology* 130, 1475-82 (1992).
262. Stephens, J. M., Butts, M., Stone, R., Pekala, P. H. & Bernlohr, D. A. Regulation of transcription factor mRNA accumulation during 3T3-L1 preadipocyte differentiation by antagonists of adipogenesis. *Mol Cell Biochem* 123, 63-71 (1993).
263. Kim, H. S. et al. Induction of apoptosis by all-trans-retinoic acid and C2-ceramide treatment in rat stromal-vascular cultures. *Biochem Biophys Res Commun* 270, 76-80 (2000).
264. Antras, J., Lasnier, F. & Pairault, J. Adipsin gene expression in 3T3-F442A adipocytes is posttranscriptionally down-regulated by retinoic acid. *J Biol Chem* 266, 1157-61 (1991).
265. Kamei, Y. et al. Lipoprotein lipase enzyme expression in 3T3-L1

- adipocytes is posttranscriptionally down-regulated by retinoic acid. *Biochem Int* 26, 923-34 (1992).
266. Menendez, C. et al. Retinoic acid and vitamin D(3) powerfully inhibit in vitro leptin secretion by human adipose tissue. *J Endocrinol* 170, 425-31 (2001).
267. Mercader, J. et al. Remodeling of white adipose tissue after retinoic acid administration in mice. *Endocrinology* 147, 5325-32 (2006).
268. Oberkofler, H. et al. Uncoupling protein gene: quantification of expression levels in adipose tissues of obese and non-obese humans. *J Lipid Res.* 38, 2125 (1997).
269. Champigny, O. & Ricquier, D. Evidence from in vitro differentiating cells that adrenoceptor agonists can increase uncoupling protein mRNA level in adipocytes of adult humans: an RT-PCR study. *J Lipid Res.* 37, 1907 (1996).
270. Oppert, J. M. et al. DNA polymorphism in the uncoupling protein (UCP) gene and human body fat. *Int J Obes Relat Metab Disord* 18, 526-31 (1994).
271. Nedergaard, J., Bengtsson, T. & Cannon, B. Unexpected Evidence for Active Brown Adipose Tissue in Adult Humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* (2007).
272. Mitchell, S. W. Singular case of absence of adipose matter in the upper half of the body. *Am J Med Sci*, 105 106 (1885).
273. Carr, A. et al. A syndrome of peripheral lipodystrophy, hyperlipidaemia and insulin resistance in patients receiving HIV protease inhibitors. *Aids* 12, F51 (1998).
274. Lo, J. C., Mulligan, K., Tai, V. W., Algren, H. & Schambelan, H. Body shape changes in HIV-infected patients. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology* 19, 307 (1998).
275. Carr, A. et al. Diagnosis, prediction, and natural course of HIV-1 protease-inhibitor-associated lipodystrophy, hyperlipidaemia, and diabetes mellitus: a cohort study. *Lancet* 353, 2093 (1999).
276. Dube, M. P., Johnson, D. L., Currier, J. S. & Leedom, J. M. Protease inhibitor-associated hyperglycaemia. *Lancet* 350, 713 (1997).
277. Sutinen, J. et al. Increased fat accumulation in the liver in HIV-infected patients with antiretroviral therapy-associated lipodystrophy. *Aids* 16, 2183 (2002).
278. Tong, Q. et al. Regulation of adiponectin in human immunodeficiency virus-infected patients: relationship to body composition and metabolic indices. *J Clin. Endocrinol. Metab* 88, 1559 (2003).
279. Miller, J. et al. HIV lipodystrophy: prevalence, severity and correlates of risk in Australia. *HIV Medicine* 4(3):293-301 (2003).

280. Martinez, E. et al. Risk of lipodystrophy in HIV-1-infected patients treated with protease inhibitors: a prospective cohort study. *Lancet* 357, 592-8 (2001).
281. Villarroya, F., Domingo, P. & Giralt, M. Lipodystrophy associated with highly active anti-retroviral therapy for HIV infection: the adipocyte as a target of anti-retroviral-induced mitochondrial toxicity. *Trends in Pharmacological Sciences* 26, 88 (2005).
282. Arnaudo, E. et al. Depletion of muscle mitochondrial DNA in AIDS patients with zidovudine-induced myopathy. *Lancet* 337, 508 (1991).
283. Dalakas, M. C. et al. Mitochondrial myopathy caused by long-term zidovudine therapy. *N.Engl.J Med* 322, 1098 (1990).
284. Lewis, W. et al. Fialuridine and its metabolites inhibit DNA polymerase gamma at sites of multiple adjacent analog incorporation, decrease mtDNA abundance, and cause mitochondrial structural defects in cultured hepatoblasts. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* 93, 3592 (1996).
285. Lewis, W., Gonzalez, B., Chomyn, A. & Papoian, T. Zidovudine induces molecular, biochemical, and ultrastructural changes in rat skeletal muscle mitochondria. *J Clin.Invest* 89, 1354 (1992).
286. Lewis, W. et al. Depletion of mitochondrial DNA, destruction of mitochondria, and accumulation of lipid droplets result from fialuridine treatment in woodchucks (*Marmota monax*). *Lab Invest* 76, 77 (1997).
287. Lewis, W. et al. Antiretroviral nucleosides, deoxynucleotide carrier and mitochondrial DNA: evidence supporting the DNA pol gamma hypothesis. *Aids* 20, 675 (2006).
288. Eriksson, S., Cederlund, E., Bergman, T., Jornvall, H. & Bohman, C. Characterization of human deoxycytidine kinase. Correlation with cDNA sequences. *FEBS Lett.* 280, 363 (1991).
289. Eriksson, S., Kierdaszuk, B., Munch-Petersen, B., Oberg, B. & Johansson, N. G. Comparison of the substrate specificities of human thymidine kinase 1 and 2 and deoxycytidine kinase toward antiviral and cytostatic nucleoside analogs. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 176, 586 (1991).
290. Eriksson, S., Munch-Petersen, B., Kierdaszuk, B. & Arner, E. Expression and substrate specificities of human thymidine kinase 1, thymidine kinase 2 and deoxycytidine kinase. *Adv.Exp.Med Biol.* 309B, 239 (1991).
291. Lafontan, M. & Berlan, M. Do regional differences in adipocyte biology provide new pathophysiological insights? *Trends Pharmacol.Sci* 24, 276 (2003).
292. Deveaud, C., Beauvoit, B., Salin, B., Schaeffer, J. & Rigoulet, M. Regional differences in oxidative capacity of rat white adipose tissue are linked to the mitochondrial

- content of mature adipocytes.
Mol.Cell Biochem. 267, 157 (2004).
293. Rylova, S. N., Albertioni, F., Flygh, G. & Eriksson, S. Activity profiles of deoxynucleoside kinases and 5'-nucleotidases in cultured adipocytes and myoblastic cells: insights into mitochondrial toxicity of nucleoside analogs. Biochem.Pharmacol. 69, 951 (2005).
294. Sutinen, J., Walker, U. A. & Sevastinova, K. Uridine supplementation increases subcutaneous fat in patients with HAART-associated lipodystrophy: a randomized, placebo-controlled trial. Antivir.Ther. 10 (2005).
295. Walker, U. A. et al. Uridine abrogates the adverse effects of antiretroviral pyrimidine analogues on adipose cell functions. Antivir.Ther. 11, 25 (2006).
296. Lim, S. E., Longley, M. J. & Copeland, W. C. The mitochondrial p55 accessory subunit of human DNA polymerase gamma enhances DNA binding, promotes processive DNA synthesis, and confers N-ethylmaleimide resistance. J Biol.Chem. 274, 38197 (1999).
297. Longley, M. J., Nguyen, D., Kunkel, T. A. & Copeland, W. C. The fidelity of human DNA polymerase gamma with and without exonucleolytic proofreading and the p55 accessory subunit. J Biol.Chem. 276, 38555 (2001).
298. Mitsuya, H., Yarchoan, R. & Broder, S. Molecular targets for AIDS therapy. Science 249, 1533 (1990).
299. Mitsuya, H. et al. 3'-Azido-3'-deoxythymidine (BW A509U): an antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus in vitro. Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A 82, 7096 (1985).
300. Lim, S. E. & Copeland, W. C. Differential incorporation and removal of antiviral deoxynucleotides by human DNA polymerase gamma. J Biol.Chem. 276, 23616 (2001).
301. Gerschenson, M., Shiramizu, B., LiButti, D. E. & Shikuma, C. M. Mitochondrial DNA levels of peripheral blood mononuclear cells and subcutaneous adipose tissue from thigh, fat and abdomen of HIV-1 seropositive and negative individuals. Antiviral Therapy 10, M83 (2005).
302. Miro, O., Lopez, S., Cardellach, F. & Casademont, J. Mitochondrial studies in HAART-related lipodystrophy: from experimental hypothesis to clinical findings. Antiviral Therapy 10, M73 (2005).
303. Nolan, D. et al. Mitochondrial DNA depletion and morphologic changes in adipocytes associated with nucleoside reverse transcriptase inhibitor therapy. Aids 17, 1329 (2003).
304. Pace, C. S. et al. Mitochondrial proliferation, DNA depletion and adipocyte differentiation in subcutaneous adipose tissue of HIV-positive FLAART recipients. Antiviral Therapy 8, 323 (2003).

305. Cherry, C. L. et al. Increased adipocyte apoptosis in lipoatrophy improves within 48 weeks of switching patient therapy from Stavudine to abacavir or zidovudine. *J Acquir.Immune.Defic.Syindr.* 38, 263 (2005).
306. McComsey, G. A. et al. Improvements in lipoatrophy, mitochondrial DNA levels and fat apoptosis after replacing stavudine with abacavir or zidovudine. *Aids* 19, 15 (2005).
307. Hammond, E., Nolan, D., James, I., Metcalf, C. & Mallal, S. Reduction of mitochondrial DNA content and respiratory chain activity occurs in adipocytes within 6-12 months of commencing nucleoside reverse transcriptase inhibitor therapy. *Aids* 18, 815 (2004).
308. Boyd, M. A. et al. Changes in body composition and mitochondrial nucleic acid content in patients switched from failed nucleoside analogue therapy to ritonavir-boosted indinavir and efavirenz. *J Infect.Dis.* 194, 642 (2006).
309. Hammond, E., Nolan, D. & McKinnon, E. Assessing the contribution of ART, HIV and host factors to adipose tissue, occurring in HIV-infected individuals: risk profile for lipoatrophy. *Antivir.Ther.* 10 (2005).
310. Kim, M., Leclercq, P. & Cervera, P. A 6 month ART interruption in HIV-infected patients improves adipose tissue morphology and gene expression (ANRS EP29 Lipostop). *Antivir.Ther.* 11 (2006).
311. Jones, S. P. et al. Assessment of adipokine expression and mitochondrial toxicity in HIV patients with lipoatrophy on stavudine- and zidovudine-containing regimens. *J Acquir.Immune.Defic.Syindr.* 40, 565 (2005).
312. Mallon, P. W. et al. In vivo, nucleoside reverse-transcriptase inhibitors alter expression of both mitochondrial and lipid metabolism genes in the absence of depletion of mitochondrial DNA. *J Infect.Dis.* 191, 1686 (2005).
313. Wallace, D. C. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 283, 1482 (1999).
314. Van Schothorst, E. M. et al. Adipose gene expression patterns of weight gain suggest counteracting steroid hormone synthesis. *Obes.Res.* 13, 1031 (2005).
315. Betteridge, D. J. What is oxidative stress? *Metabolism* 49, 3 (2000).
316. Flint, D. H., Tuminello, J. F. & Emptage, M. H. The inactivation of Fe-S cluster containing hydro-lyases by superoxide. *J Biol.Chem.* 268, 22369 (1993).
317. Jan, V. et al. Altered fat differentiation and adipocytokine expression are inter-related and linked to morphological changes and insulin resistance in HIV-1-infected lipodystrophic patients. *Antivir.Ther.* 9, 555 (2004).
318. Domingo, P. et al. Subcutaneous adipocyte apoptosis in HIV-1

- protease inhibitor-associated lipodystrophy. *Aids* 13, 2261 (1999).
319. Domingo, P. et al. Tumour necrosis factor alpha in fat redistribution syndromes associated with combination antiretroviral therapy in HIV-1-infected patients: potential role in subcutaneous adipocyte apoptosis. *Eur.J Clin.Invest* 35, 771 (2005).
320. Lloreta, J. et al. Ultrastructural features of highly active antiretroviral therapy-associated partial lipodystrophy. *Virchows Arch.* 441, 599 (2002).
321. Weaver, J. G. et al. Inhibition of adenine nucleotide translocator pore function and protection against apoptosis in vivo by an HIV protease inhibitor. *J Clin.Invest* 115, 1828 (2005).
322. Ben Romano, R. et al. Nelfinavir induces adipocyte insulin resistance through the induction of oxidative stress: differential protective effect of antioxidant agents. *Antivir.Ther.* 11, 1051 (2006).
323. Gasic, S., Tian, B. & Green, A. Tumor necrosis factor alpha stimulates lipolysis in adipocytes by decreasing Gi protein concentrations. *J Biol.Chem.* 274, 6770 (1999).
324. Domingo, P. et al. Switching to nevirapine decreases insulin levels but does not improve subcutaneous adipocyte apoptosis in patients with highly active antiretroviral therapy-associated lipodystrophy. *Journal of Infectious Diseases* 184, 1197 (2001).
325. Dagon, Y., Avraham, Y. & Berry, E. M. AMPK activation regulates apoptosis, adipogenesis, and lipolysis by eIF2alpha in adipocytes. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 340, 43 (2006).
326. Birk, R. Z. & Rubinstein, M. IFN-alpha induces apoptosis of adipose tissue cells. *Biochem Biophys Res Commun* 345, 669-74 (2006).
327. Lagathu, C. et al. PIs and NRTIs increase oxidative stress and proinflammatory cytokine and chemokine production in human and murine adipocytes and macrophages. *Antivir.Ther.* 10 (2005).
328. Agrawal, L., Louboutin, J. P. & Strayer, D. S. Preventing HIV-1 tat-induced neuronal apoptosis using antioxidant enzymes: Mechanistic and therapeutic implications. *Virology* (2007).
329. Prakash, O. et al. The human immunodeficiency virus type 1 Tat protein potentiates zidovudine-induced cellular toxicity in transgenic mice. *Arch.Biochem.Biophys.* 343, 173 (1997).
330. Raidel, S. M. et al. Targeted myocardial transgenic expression of HIV Tat causes cardiomyopathy and mitochondrial damage. *Am J Physiol Heart Circ.Physiol* 282, H1672 (2002).
331. Boya, P. et al. Viral proteins targeting mitochondria: controlling cell death. *Biochim.Biophys.Acta* 1659, 178 (2004).

332. Muthumani, K. et al. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Vpr-regulated cell death: insights into mechanism. *Cell Death.Differ.* 12 Suppl 1, 962 (2005).
333. Casula, M. et al. Infection with HIV-1 induces a decrease in mtDNA. *J Infect.Dis.* 191, 1468 (2005).
334. Lopez, S., Garrabou, G. & Mart^oez, E. Mitochondrial studies in adipose tissue of HIV-infected patients without fat redistribution. *Antivir.Ther.* 9 (2004).
335. Lagathu, C. et al. HIV antiretroviral treatment alters adipokine expression and insulin sensitivity of adipose tissue in vitro and in vivo. *Biochimie* 87, 65 (2005).
336. Dahlman, I. et al. Downregulation of electron transport chain genes in visceral adipose tissue in type 2 diabetes independent of obesity and possibly involving tumor necrosis factor-alpha. *Diabetes* 55, 1792 (2006).
337. Warne, J. P. Tumour necrosis factor alpha: a key regulator of adipose tissue mass. *J Endocrinol.* 177, 351 (2003).
338. Gougeon, M. L. et al. Adipocytes targets and actors in the pathogenesis of HIV-associated lipodystrophy and metabolic alterations. *Antivir.Ther.* 9, 161 (2004).
339. Caron, M. et al. The HIV-1 nucleoside reverse transcriptase inhibitors stavudine and zidovudine alter adipocyte functions in vitro. *Aids* 18, 2127 (2004).
340. Pacenti, M. et al. Microarray analysis during adipogenesis identifies new genes altered by antiretroviral drugs. *Aids* 20, 1691 (2006).
341. El Hadri, K. et al. In vitro suppression of the lipogenic pathway by the nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor efavirenz in 3T3 and human preadipocytes or adipocytes. *J Biol.Chem.* 279, 15130 (2004).
342. Rosen, E. D., Walkey, C. J., Puigserver, P. & Spiegelman, B. M. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev.* 14, 1293 (2000).
343. Caron, M. et al. The HIV protease inhibitor indinavir impairs sterol regulatory element-binding protein-1 intranuclear localization, inhibits preadipocyte differentiation, and induces insulin resistance. *Diabetes* 50, 1378 (2001).
344. Yki-Jarvinen, H. Thiazolidinediones. *N.Engl.J Med* 351, 1106 (2004).
345. Bastard, J. P. et al. Association between altered expression of adipogenic factor SREBP1 in lipoatrophic adipose tissue from HIV-1-infected patients and abnormal adipocyte differentiation and insulin resistance. *Lancet* 359, 1026 (2002).
346. Johnson, J. A. et al. Increased systemic and adipose tissue cytokines in patients with

- HIV-associated lipodystrophy. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 286, E261 (2004).
347. Lihn, A. S. et al. Increased expression of TNF-alpha, IL-6, and IL-8 in HALS: implications for reduced adiponectin expression and plasma levels. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* 285, E1072 (2003).
348. Christeff, N., De Truchis, P., Melchior, J. C., Perronne, C. & Gougeon, M. L. Longitudinal evolution of HIV-1-associated lipodystrophy is correlated to serum cortisol:DHEA ratio and IFN-alpha. *Eur.J Clin.Invest* 32, 775 (2002).
349. Lagathu, C. et al. Antiretroviral drugs with adverse effects on adipocyte lipid metabolism and survival alter the expression and secretion of proinflammatory cytokines and adiponectin in vitro. *Antivir.Ther.* 9, 911 (2004).
350. Laurence, J., Mitra, D., Steiner, M., Staiano-Coico, L. & Jaffe, E. Plasma from patients with idiopathic and human immunodeficiency virus-associated thrombotic thrombocytopenic purpura induces apoptosis in microvascular endothelial cells. *Blood* 87, 3245 (1996).
351. Shankar, S. S. & Dube, M. P. Clinical aspects of endothelial dysfunction associated with human immunodeficiency virus infection and antiretroviral agents. *Cardiovasc.Toxicol.* 4, 261 (2004).
352. Chi, D. et al. The effects of HIV infection on endothelial function. *Endothelium* 7, 223 (2000).
353. Park, I. W., Wang, J. F. & Groopman, J. E. HIV-1 Tat promotes monocyte chemoattractant protein-1 secretion followed by transmigration of monocytes. *Blood* 97, 352 (2001).
354. Fain, J. N. Release of interleukins and other inflammatory cytokines by human adipose tissue is enhanced in obesity and primarily due to the nonfat cells. *Vitam.Horm.* 74, 443 (2006).
355. Hadigan, C., Borgonha, S., Rabe, J., Young, V. & Grinspoon, S. Increased rates of lipolysis among human immunodeficiency virus-infected men receiving highly active antiretroviral therapy. *Metabolism* 51, 1143 (2002).
356. Hadigan, C., Liebaw, J., Torriani, M., Andersen, R. & Grinspoon, S. Improved triglycerides and insulin sensitivity with 3 months of acipimox in human immunodeficiency virus-infected patients with hypertriglyceridemia. *J Clin.Endocrinol.Metab* 91, 4438 (2006).
357. van, d. V. et al. Highly active antiretroviral therapy-induced lipodystrophy has minor effects on human immunodeficiency virus-induced changes in lipolysis, but normalizes resting energy expenditure. *J Clin.Endocrinol.Metab* 87, 5066 (2002).

358. Janneh, O. et al. Intracellular disposition and metabolic effects of zidovudine, stavudine and four protease inhibitors in cultured adipocytes. *Antivir. Ther.* 8, 417 (2003).
359. Ranganathan, S. & Kern, P. A. The HIV protease inhibitor saquinavir impairs lipid metabolism and glucose transport in cultured adipocytes. *J Endocrinol.* 172, 155 (2002).
360. van, d. V. et al. Markedly diminished lipolysis and partial restoration of glucose metabolism, without changes in fat distribution after extended discontinuation of protease inhibitors in severe lipodystrophic human immunodeficient virus-1-infected patients. *J Clin. Endocrinol. Metab.* 89, 3554 (2004).
361. Trujillo, M. E. et al. Interleukin-6 regulates human adipose tissue lipid metabolism and leptin production in vitro. *J Clin. Endocrinol. Metab.* 89, 5577 (2004).
362. Haugaard, S. B. et al. Tumor necrosis factor alpha is associated with insulin-mediated suppression of free fatty acids and net lipid oxidation in HIV-infected patients with lipodystrophy. *Metabolism* 55, 175 (2006).
363. Suganami, T., Nishida, J. & Ogawa, Y. A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor alpha. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25, 2062 (2005).
364. Barraquer, L. Histoire clinique d'un cas d'atrophie du tissu celluloadipeux. *Neurolog Centralblatt*, 1072 (1907).
365. Simons, A. Eine seltmen Trophoneurose ("Lipodystrophia Progressiva"). *Z Gesamte Neurol Psychiatr*, 29 (1911).
366. Garg, A. Lipodystrophies. *American Journal of Medicine* 108, 143 (2000).
367. Jasin, H. E. Systemic lupus erythematosus, partial lipodystrophy and hypocomplementemia. *J. Rheumatol.* 6, 43 (1979).
368. Torrelo, A., Espana, A., Boixeda, P. & Ledo, A. Partial lipodystrophy and dermatomyositis. *Arch. Dermatol.* 127, 1846 (1991).
369. West, C. D. & McAdams, A. J. The alternative pathway C3 convertase and glomerular deposits. *Pediatr. Nephrol.* 13, 448 (1999).
370. Mathieson, P. W., Wurzner, R., Oliveria, D. B., Lachmann, P. J. & Peters, D. K. Complement-mediated adipocyte lysis by nephritic factor sera. *J. Exp. Med.* 177, 1827 (1993).
371. Khanna, N., Sirka, C., Gupta, S. & Singh, M. Lipodystrophy following hepatitis infection: a causative relationship? *J Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 18, 345 (2004).
372. Zylberberg, H., Nalpas, B., Pol, S., Brechot, C. & Viard, J. P. Is there a relationship between hepatitis C virus infection and

- antiretroviral-associated lipoatrophy? *Aids* 14, 2055 (2000).
373. Misra, A. & Garg, A. Clinical features and metabolic derangements in acquired generalized lipodystrophy: case reports and review of the literature. *Medicine (Baltimore)* 82, 129 (2003).
374. Bolan, C., Oral, E. A., Gorden, P., Taylor, S. & Leitman, S. F. Intensive, long-term plasma exchange therapy for severe hypertriglyceridemia in acquired generalized lipoatrophy. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 87, 380 (2002).
375. Haque, W. A., Shimomura, I., Matsuzawa, Y. & Garg, A. Serum adiponectin and leptin levels in patients with lipodystrophies. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 87, 2395 (2002).
376. Billings, J. K., Milgraum, S. S., Gupta, A. K., Headington, J. T. & Rasmussen, J. E. Lipoatrophic panniculitis: a possible autoimmune inflammatory disease of fat. Report of three cases. *Arch.Dermatol.* 123, 1662 (1987).
377. Gschwand.Wr & Munzberg.H. Lipoatrophia Semicircularis - Linear Circular Atrophy of Subcutaneous Fat on Extremities. *Hautarzt* 25, 222 (1974).
378. Flagothier, C., Quatresooz, P. & Pierard, G. E. Electromagnetic lipolysis and semicircular lipoatrophy of the thighs. *Annales de Dermatologie et de Venereologie* 133, 577 (2006).
379. Gomez-Espejo, C., Perez-Bernal, A. & Camacho-Martinez, F. A new case of semicircular lipoatrophy associated with repeated external microtraumas and review of the literature. *J Eur.Acad.Dermatol.Venereol.* 19, 459 (2005).
380. Hodak, E., David, M. & Sandbank, M. Semicircular lipoatrophy--a pressure-induced lipoatrophy? *Clin.Exp.Dermatol.* 15, 464 (1990).
381. Gruber, P. C. & Fuller, L. C. Lipoatrophy semicircularis induced by trauma. *Clin.Exp.Dermatol.* 26, 269 (2001).
382. Berardinelli, W. An Undiagnosed Endocrinometabolic Syndrome - Report of 2 Cases. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 14, 193 (1954).
383. Seip, M. Lipodystrophy and gigantism with associated endocrine manifestations. A new diencephalic syndrome? *Acta Paediatr.* 48, 555 (1959).
384. Seip, M. & Trygstad, O. Generalized lipodystrophy, congenital and acquired (lipoatrophy). *Acta Paediatrica* 85, 2 (1996).
385. Van Maldergem, L. et al. Genotype-phenotype relationships in Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy. *J.Med.Genet.* 39, 722 (2002).
386. Agarwal, A. K. et al. AGPAT2 is mutated in congenital generalized lipodystrophy linked to chromosome

- 9q34. *Nature Genetics* 31, 21 (2002).
387. Garg, A., Chandalia, M. & Vuitch, F. Severe islet amyloidosis in congenital generalized lipodystrophy. *Diabetes Care* 19, 28 (1996).
388. Garg, A. et al. A gene for congenital generalized lipodystrophy maps to human chromosome 9q34. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 84, 3390 (1999).
389. West, J. et al. Cloning and expression of two human lysophosphatidic acid acyltransferase cDNAs that enhance cytokine-induced signaling responses in cells. *Dna and Cell Biology* 16, 691 (1997).
390. Leung, D. W. The structure and functions of human lysophosphatidic acid acyltransferases. *Frontiers in Bioscience* 6, D944 (2001).
391. Fang, Y. M., Vilella-Bach, M., Bachmann, R., Flanigan, A. & Chen, J. Phosphatidic acid-mediated mitogenic activation of mTOR signaling. *Science* 294, 1942 (2001).
392. Garg, A., Fleckenstein, J. L., Peshock, R. M. & Grundy, S. M. Peculiar Distribution of Adipose-Tissue in Patients with Congenital Generalized Lipodystrophy. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 75, 358 (1992).
393. Chandalia, M., Garg, A., Vuitch, F. & Nizzi, F. Postmortem Findings in Congenital Generalized Lipodystrophy. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 80, 3077 (1995).
394. Simha, V. & Garg, A. Phenotypic heterogeneity in body fat distribution in patients with congenital generalized lipodystrophy caused by mutations in the AGPAT2 or Seipin genes. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 88, 5433 (2003).
395. Magre, J. et al. Identification of the gene altered in Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy on chromosome 11q13. *Nature Genetics* 28, 365 (2001).
396. Simha, V., Agarwal, A. K., Oral, E. A., Fryns, J. P. & Garg, A. Genetic and phenotypic heterogeneity in patients with mandibuloacral dysplasia-associated lipodystrophy. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 88, 2821 (2003).
397. Heathcote, K. et al. Molecular analysis of Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy in Oman - Evidence for multiple loci. *Diabetes* 51, 1291 (2002).
398. Magre, J. et al. Prevalence of mutations in AGPAT2 among human lipodystrophies. *Diabetes* 52, 1573 (2003).
399. Agarwal, A. K. et al. Phenotypic and genetic heterogeneity in congenital generalized lipodystrophy. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 88, 4840 (2003).
400. Dunnigan, M. G., Cochrane, M. A., Kelly, A. & Scott, J. W. Familial

- Lipoatrophic Diabetes with Dominant Transmission - New Syndrome. *Quarterly Journal of Medicine* 43, 33 (1974).
401. Garg, A., Peshock, R. M. & Fleckenstein, J. L. Adipose tissue distribution pattern in patients with familial partial lipodystrophy (Dunnigan variety). *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 84, 170 (1999).
402. Garg, A. Gender differences in the prevalence of metabolic complications in familial partial lipodystrophy (Dunnigan variety). *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 85, 1776 (2000).
403. Haque, W. A. et al. Risk factors for diabetes in familial partial lipodystrophy, Dunnigan variety. *Diabetes Care* 26, 1350 (2003).
404. Haque, W. A., Vuitch, F. & Garg, A. Post-mortem findings in familial partial lipodystrophy, Dunnigan variety. *Diabetic Medicine* 19, 1022 (2002).
405. Cao, H. & Hegele, R. A. Nuclear lamin A/C R482Q mutation in Canadian kindreds with Dunnigan-type familial partial lipodystrophy. *Human Molecular Genetics* 9, 109 (2000).
406. Speckman, R. A. et al. Mutational and haplotype analyses of families with familial partial lipodystrophy (Dunnigan variety) reveal recurrent missense mutations in the globular C-terminal domain of lamin A/C. *American Journal of Human Genetics* 66, 1192 (2000).
407. Shackleton, S. et al. LMNA, encoding lamin A/C, is mutated in partial lipodystrophy. *Nature Genetics* 24, 153 (2000).
408. Vigouroux, C. et al. Lamin A/C gene - Sex-determined expression of mutations in dunnigan-type familial partial lipodystrophy and absence of coding mutations in congenital and acquired generalized lipoatrophy. *Diabetes* 49, 1958 (2000).
409. Garg, A., Speckman, R. A. & Bowcock, A. M. Multisystem dystrophy syndrome due to novel missense mutations in the amino-terminal head and alpha-helical rod domains of the lamin A/C gene. *Am.J.Med.* 112, 549 (2002).
410. Lin, F. & Worman, H. J. Structural organization of the human gene encoding nuclear lamin A and nuclear lamin C. *J.Biol.Chem.* 268, 16321 (1993).
411. Fisher, D. Z., Chaudhary, N. & Blobel, G. cDNA sequencing of nuclear lamins A and C reveals primary and secondary structural homology to intermediate filament proteins. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 83, 6450 (1986).
412. Burke, B. & Stewart, C. L. Life at the edge: the nuclear envelope and human disease. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 3, 575 (2002).
413. Lloyd, D. J., Trembath, R. C. & Shackleton, S. A novel interaction between lamin A and SREBP1: implications for partial lipodystrophy and other

- laminopathies. *Hum.Mol.Genet.* 11, 769 (2002).
414. Vigouroux, C. et al. Nuclear envelope disorganization in fibroblasts from lipodystrophic patients with heterozygous R482Q/W mutations in the lamin A/C gene. *J.Cell Sci.* 114, 4459 (2001).
415. Lelliott, C. J. et al. Lamin expression in human adipose cells in relation to anatomical site and differentiation state. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 87, 728 (2002).
416. Garg, A., Vinaitheerthan, M., Weatherall, P. T. & Bowcock, A. M. Phenotypic heterogeneity in patients with familial partial lipodystrophy (Dunnigan variety) related to the site of missense mutations in lamin A/C gene. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 86, 59 (2001).
417. Savage, D. B. et al. Human metabolic syndrome resulting from dominant-negative mutations in the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Diabetes* 52, 910 (2003).
418. Ludtke, A. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma C190S mutation causes partial lipodystrophy. *J Clin.Endocrinol.Metab* (2007).
419. Barroso, I. et al. Dominant negative mutations in human PPARgamma associated with severe insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension. *Nature* 402, 880 (1999).
420. Hegele, R. A., Cao, H., Frankowski, C., Mathews, S. T. & Leff, T. PPARG F388L, a transactivation-deficient mutant, in familial partial lipodystrophy. *Diabetes* 51, 3586 (2002).
421. Simha, V. & Garg, A. Body fat distribution and metabolic derangements in patients with familial partial lipodystrophy associated with mandibuloacral dysplasia. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 87, 776 (2002).
422. Cutler, D. L., Kaufmann, S. & Freidenberg, G. R. Insulin-resistant diabetes mellitus and hypermetabolism in mandibuloacral dysplasia: a newly recognized form of partial lipodystrophy. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 73, 1056 (1991).
423. Novelli, G. et al. Mandibuloacral dysplasia is caused by a mutation in LMNA-encoding lamin A/C. *Am.J.Hum.Genet.* 71, 426 (2002).
424. Agarwal, A. K., Fryns, J. P., Auchus, R. J. & Garg, A. Zinc metalloproteinase, ZMPSTE24, is mutated in mandibuloacral dysplasia. *Hum.Mol.Genet.* 12, 1995 (2003).
425. Lo, J. C., Mulligan, K., Tai, V. W., Algren, H. & Schambelan, M. "Buffalo hump" in men with HIV-1 infection. *Lancet* 351, 867 (1998).
426. Saint-Marc, T. & Touraine, J. L. "Buffalo hump" in HIV-1 infection. *Lancet* 352, 319 (1998).
427. Fessel, W. J., Follansbee, S. B. & Barker, B. Ultrastructural findings

- consistent with brown adipocytes in buffalo humps of HIV-positive patients with fat redistribution syndrome. *Antiviral Therapy*, 25 (2000).
428. Guaraldi, G. et al. Facial lipohypertrophy in HIV-infected subjects who underwent autologous fat tissue transplantation. *Clinical Infectious Diseases* 40, E13 (2005).
429. Rodriguez de la Concepcion, M. L., Domingo, J. C., Domingo, P., Giralt, M. & Villarroya, F. Uncoupling protein 1 gene expression implicates brown adipocytes in highly active antiretroviral therapy-associated lipomatosis. *Aids* 18, 959 (2004).
430. Vila, M. R. et al. Uncoupling protein-1 mRNA expression in lipomas from patients bearing pathogenic mitochondrial DNA mutations. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 278, 800 (2000).
431. Urso, R. & Gentile, M. Are 'buffalo hump' syndrome, Madelung's disease and multiple symmetrical lipomatosis variants of the same dysmetabolism? *Aids* 15, 290 (2001).
432. Mallon, P. W. et al. HIV Lipodystrophy Case Definition Study; Australian Lipodystrophy Prevalence Survey Investigators. Buffalo hump seen in HIV-associated with hyperinsulinemia but not dyslipidemia. *J Acquir.Immune.Defic.Syindr.*, 156 (2005).
433. Rodriguez de la Concepcion, M. L. et al. Reverse transcriptase inhibitors alter uncoupling protein-1 and mitochondrial biogenesis in brown adipocytes. *Antivir.Ther.* 10, 515 (2005).
434. Yang, X., Enerback, S. & Smith, U. Reduced expression of FOXC2 and brown adipogenic genes in human subjects with insulin resistance. *Obes.Res.* 11, 1182 (2003).
435. Laplante, M. et al. Mechanisms of the depot specificity of peroxisome proliferator-activated receptor gamma action on adipose tissue metabolism. *Diabetes* 55, 2771 (2006).
436. Hondares, E. et al. Thiazolidinediones and rexinoids induce peroxisome proliferator-activated receptor-coactivator (PGC)-1alpha gene transcription: an autoregulatory loop controls PGC-1alpha expression in adipocytes via peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivation. *Endocrinology* 147, 2829 (2006).
437. Bogacka, I., Xie, H., Bray, G. A. & Smith, S. R. Pioglitazone induces mitochondrial biogenesis in human subcutaneous adipose tissue in vivo. *Diabetes* 54, 1392 (2005).
438. DiMauro, S. Mitochondrial diseases. *Biochim.Biophys.Acta* 1658, 80 (2004).
439. Pineda, M. et al. Peripheral neuropathy with ataxia in childhood as a result of the G8363A mutation in mitochondrial DNA. *Pediatr.Res.* 56, 55 (2004).

440. Larsson, N. G., Tulinius, M. H., Holme, E. & Oldfors, A. Pathogenetic aspects of the A8344G mutation of mitochondrial DNA associated with MERRF syndrome and multiple symmetric lipomas. *Muscle Nerve* 3, S102 (1995).
441. Casali, C. et al. Mitochondrial G8363A mutation presenting as cerebellar ataxia and lipomas in an Italian family. *Neurology* 52, 1103 (1999).
442. Holme, E. et al. Multiple symmetric lipomas with high levels of mtDNA with the tRNA(Lys) A-->G(8344) mutation as the only manifestation of disease in a carrier of myoclonus epilepsy and ragged-red fibers (MERRF) syndrome. *Am.J Hum.Genet.* 52, 551 (1993).
443. Kelly, D. P. & Scarpulla, R. C. Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. *Genes Dev.* 18, 357 (2004).
444. Kannisto, K. et al. Expression of adipogenic transcription factors, peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1, IL-6 and CD45 in subcutaneous adipose tissue in lipodystrophy associated with highly active antiretroviral therapy. *Aids* 17, 1753 (2003).
445. Sutinen, J. et al. Circulating concentration of adiponectin and its expression in subcutaneous adipose tissue in patients with highly active antiretroviral therapy-associated lipodystrophy. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 88, 1907 (2003).
446. Brinkman, K., Smeitink, J. A., Romijn, J. A. & Reiss, P. Mitochondrial toxicity induced by nucleoside-analogue reverse-transcriptase inhibitors is a key factor in the pathogenesis of antiretroviral-therapy-related lipodystrophy. *Lancet* 354, 1112 (1999).
447. Nerurkar, P. V., Shikuma, C. M. & Nerurkar, V. R. Sterol regulatory element-binding proteins and reactive oxygen species: potential role in highly-active antiretroviral therapy (HAART)-associated lipodystrophy. *Clin.Biochem.* 34, 519 (2001).
448. Rousset, S. et al. The biology of mitochondrial uncoupling proteins. *Diabetes* 53 Suppl 1, S130 (2004).
449. Boss, O. et al. Uncoupling protein-3 expression in skeletal muscle and free fatty acids in obesity. *Lancet* 351, 1933 (1998).
450. Viguerie, N. et al. Adipose tissue gene expression in obese subjects during low-fat and high-fat hypocaloric diets. *Diabetologia* 48, 123-31 (2005).
451. Mondal, D., LaRussa, V. F. & Agrawal, K. C. Synergistic antiadipogenic effects of HIV type 1 protease inhibitors with tumor necrosis factor alpha: suppression of extracellular insulin action mediated by extracellular matrix-degrading proteases. *AIDS Res.Hum.Retroviruses* 17, 1569 (2001).
452. Reitman, M. L., Arioglu, E., Gavrilova, O. & Taylor, S. I.

- Lipoatrophy revisited. *Trends Endocrinol.Metab* 11, 410 (2000).
453. Ledru, E. et al. Alteration of tumor necrosis factor-alpha T-cell homeostasis following potent antiretroviral therapy: contribution to the development of human immunodeficiency virus-associated lipodystrophy syndrome. *Blood* 95, 3191 (2000).
454. Maurin, T. et al. Tumor necrosis factor-alpha stimulates HIV-1 production in primary culture of human adipocytes. *Exp.Cell Res.* 304, 544 (2005).
455. Kino, T. & Chrousos, G. P. Human immunodeficiency virus type-1 accessory protein Vpr: a causative agent of the AIDS-related insulin resistance/lipodystrophy syndrome? *Ann.N.Y Acad.Sci.* 1024, 153 (2004).
456. Mangravite, L. M., Badagnani, I. & Giacomini, K. M. Nucleoside transporters in the disposition and targeting of nucleoside analogs in the kidney. *Eur J Pharmacol* 479, 269 (2003).
457. Casado, F.J. et al. Nucleoside transporters in absorptive epithelia. *J Physiol Biochem* 58, 207-16 (2002).
458. Hamilton, S. R. et al. Subcellular distribution and membrane topology of the mammalian concentrative Na⁺-nucleoside cotransporter rCNT1. *J Biol Chem* 276, 27981-8 (2001).
459. Kather, H. Purine accumulation in human fat cell suspensions. Evidence that human adipocytes release inosine and hypoxanthine rather than adenosine. *J Biol Chem* 263, 8803-9 (1988).
460. Guillen-Gomez, E. et al. Distribution of CNT2 and ENT1 transcripts in rat brain: selective decrease of CNT2 mRNA in the cerebral cortex of sleep-deprived rats. *J Neurochem* 90, 883-93 (2004).
461. Pinto-Duarte, A., Coelho, J. E., Cunha, R. A., Ribeiro, J. A. & Sebastiao, A. M. Adenosine A2A receptors control the extracellular levels of adenosine through modulation of nucleoside transporters activity in the rat hippocampus. *J Neurochem* 93, 595-604 (2005).
462. Aymerich, I., Foufelle, E., Ferre, P., Casado, F.J. & Pastor-Anglada, M. Extracellular adenosine activates AMP-dependent protein kinase (AMPK). *J Cell Sci* 119, 1612-21 (2006).
463. Alanko, L., Stenberg, D. & Porkka-Heiskanen, T. Nitrobenzylthioinosine (NBMPR) binding and nucleoside transporter ENT1 mRNA expression after prolonged wakefulness and recovery sleep in the cortex and basal forebrain of rat. *J Sleep Res* 12, 299-304 (2003).
464. Fruhbeck, G., Gomez-Ambrosi, J. & Salvador, J. Leptin-induced lipolysis opposes the tonic inhibition of endogenous adenosine in white adipocytes. *Faseb J* 15, 333-40 (2001).

465. Pastor-Anglada, M. et al. Nucleoside transporters in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia* 18, 385 (2004).
466. Hegele, R. A. Lessons from human mutations in PPARgamma. *Int J Obes (Lond)* 29 Suppl 1, S31-5 (2005).
467. Giralt, M. et al. HIV-1 infection alters gene expression in adipose tissue, which contributes to HIV-1/HAART-associated lipodystrophy. *Antivir. Ther.* 11, 729 (2006).
468. Wilson-Fritch, L. et al. Mitochondrial remodeling in adipose tissue associated with obesity and treatment with rosiglitazone. *Journal of Clinical Investigation* 114, 1281 (2004).
469. Rodriguez de la Concepcion, M. L. et al. Role of disturbances of brown with respect to white adipocyte biology in HAART-associated lipodystrophy and lipomatosis: studies in vitro and in vivo. *Antivir. Ther.* 10 (2005).
470. Vidal-Puig, A., Solanes, G., Grujic, D., Flier, J. S. & Lowell, B. B. UCP3: an uncoupling protein homologue expressed preferentially and abundantly in skeletal muscle and brown adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 235, 79-82 (1997).
471. Solanes, G., Pedraza, N., Iglesias, R., Giralt, M. & Villarroya, F. Functional relationship between MyoD and peroxisome proliferator-activated receptor-dependent regulatory pathways in the control of the human uncoupling protein-3 gene transcription. *Mol Endocrinol* 17, 1944-58 (2003).
472. Schoonjans, K. et al. PPARalpha and PPARgamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *Embo J* 15, 5336-48 (1996).
473. Combs, T. P. et al. Induction of adipocyte complement-related protein of 30 kilodaltons by PPARgamma agonists: a potential mechanism of insulin sensitization. *Endocrinology* 143, 998-1007 (2002).
474. Martin, A. & Mallon, P. W. Therapeutic approaches to combating lipoatrophy: do they work? *J Antimicrob Chemother* 55, 612-5 (2005).
475. Mafong, D. D. et al. Development of multiple lipomas during treatment with rosiglitazone in a patient with HIV-associated lipoatrophy. *Aids* 18, 1742-4 (2004).
476. Sears, I. B., MacGinnitie, M. A., Kovacs, L. G. & Graves, R. A. Differentiation-dependent expression of the brown adipocyte uncoupling protein gene: regulation by peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Mol Cell Biol* 16, 3410-9 (1996).
477. Lane, M. D., Tang, Q. Q. & Jiang, M. S. Role of the CCAAT enhancer binding proteins (C/EBPs) in adipocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 266, 677-83 (1999).

478. Hansen, J. B. et al. Retinoblastoma protein functions as a molecular switch determining white versus brown adipocyte differentiation. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S A 101, 4112 (2004).

ANEX

**Citotoxicitat i toxicitat mitocondrial *in vitro* del
Tenofovir per sí sol i en combinació d'altres
antiretrovirals de cèl·lules renals del túbul
proximal**

REVISTA:

ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY

2006 Nov; 50(11): 3824-32. Epub 2006, Aug 28

PMID: 16940060

Resum:

En aquest treball s'ha valorat la toxicitat del tenofovir (TFV) i s'ha comparat amb la de la zidovudina (AZT), la didanosina (ddI), ritonavir (RTV) i lopinavir (LPV), per sí sols i en combinació, en cèl·lules epitelials de ronyó del túbul proximal (RPTECs). La citotoxicitat va ser mesurada un cop les cèl·lules van ser tractades amb diferents concentracions i combinacions dels antiretrovirals al llarg de 22 dies. A més, es van valorar els nivells de mtDNA i de l'mRNA de la COX-II a les RPTECs tractades amb inhibidors de la transcriptasa.

El TFV per sí sol sembla no estar associat a toxicitat mitocondrial. Per contra, el ddI donaria lloc a una marcada citotoxicitat, que va resultar ser més elevada que la produïda per l'AZT ($P = 0,002$) i el TFV ($P = 0,0001$). La combinació de RTV $10 \mu\text{M}$ i LPV $40 \mu\text{M}$ disminuiria significativament la viabilitat de les RPTEC ($P < 0,0001$), i el TFV tendiria a reduir aquest efecte. El TFV per sí sol no afecta els nivells de mtDNA ni els nivells de l'mRNA de la COX-II, mentre que el ddI causaria una severa depleció del mtDNA i una reducció paral·lela de l'expressió de COX-II. Els efectes del ddI en el mtDNA i l'mRNA de COX-II, però no els de l'AZT, estarien encara més induïts per l'efecte del TFV, cosa que concordaria amb la inhibició de la eliminació del ddI provocada pel TFV. L'addició de TNF al ddI o a l'AZT sembla incrementar lleument el ratio nivells de l'mRNA de la COX-II/mtDNA respecte els que es troben en aquelles cèl·lules tractades amb ddI o AZT per sí sol.

Aquests resultats *in vitro* indicarien que, la combinació del TFV amb altres antiretrovirals, no incrementaria de forma prou significativa el potencial tòxic del TFV en les RPTECs.

Inhibició reversible de la síntesi de proteïnes mitocondrials durant la hiperlactatèmia associada a linezolid

REVISTA:

ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTERAPY

2007 Mar; 51(3): 962-7. Epub 2006, Dec 28

PMID: 17194826

Resum:

L'objectiu d'aquest estudi ha estat determinar els mecanismes de toxicitat mitocondrial lligats a la hiperlactatèmia associada a linezolid. Cinc pacients que seguien un tractament de linezolid van ser estudiats al llarg de la fase aguda d'hiperlactatèmia, i també, després de la seva fase de recuperació i normalització dels nivells de lactat un cop havien deixat el tractament amb linezolid. Aquests estudis van ser realitzats amb cèl·lules mononuclears de sang perifèrica (PBMCs) a les que se'ls va mesurar la massa mitocondrial, l'homeòstasi de la síntesi de proteïna mitocondrial (activitat de la citocrom c oxidasa (COX), expressió de l'mRNA de la COX-II, i el nivell de depleció de mtDNA), i la funció mitocondrial (el potencial de la membrana mitocondrial i la capacitat oxidativa de la cèl·lula).

Durant la hiperlactatèmia induïda pel linezolid, es van trobar nivells extremament reduïts de l'expressió de la COX-II (només un 16% respecte el grup control, $P < 0,001$), una proteïna codificada, transcrita i traduïda a nivell mitocondrial. D'aquesta manera, l'activitat de la COX també es va trobar disminuïda (un 51% de l'activitat total, $P < 0,05$). Aquestes davallades s'observaven tot i que els nivells dels transcrits de la COX-II es van trobar anormalment incrementats (un 297%, $P = 0,10$) i el contingut de mtDNA va romandre estable. Aquestes alteracions persistien tot i corregir-les per la massa mitocondrial, que es va trobar moderadament disminuïda durant la fase d'hiperlactatèmia. La majoria dels paràmetres van retornar al rang dels controls després de la supressió del tractament amb linezolid, normalització dels nivells de lactat, i recuperació clínica.

Així doncs, el linezolid inhibiria la síntesi de proteïnes mitocondrials, portant això a una reducció de l'activitat enzimàtica mitocondrial, que per altra banda, és revertida un cop s'abandona el tractament amb linezolid.